Technical Manual

PowerPlex® Fusion System

INSTRUCCIONES PARA UTILIZAR LOS PRODUCTOS
DC2402 Y DC2408.

www.promega.com

IMPRESO EN ESTADOS UNIDOS
9/12

Nro. de pieza: TMD039

PowerPlex® Fusion System

Toda la bibliografía técnica está disponible en Internet, en el sitio www.promega.com/protocols/
Visite el sitio web para asegurarse de estar utilizando la versión más actualizada de este manual técnico.
Comuníquese con el servicio técnico de Promega si tiene alguna pregunta acerca del uso de este sistema.
Correo electrónico: genetic@promega.com

1. Descripción 2

2. Componentes y condiciones de almacenamiento del producto 4

3. Antes de comenzar 5
   A. Precauciones 5
   B. Calibración espectral 6

4. Protocolos para la amplificación del ADN al utilizar el PowerPlex® Fusion System 6
   A. Amplificación de ADN extraído 6
   B. Amplificación directa de ADN de los perforadores de tarjetas de almacenamiento 9
   C. Amplificación directa de ADN de los hisopos 13

5. Configuración del instrumento y preparación de la muestra 16
   A. Detección de fragmentos amplificados al utilizar el 3500 o el 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems® 16
   B. Detección de fragmentos amplificados al utilizar ABI PRISM® 3100 o 3100-*Avant* Genetic Analyzer con el software de recolección de datos, Versión 2.0, o el 3130 o 3130*xl* Genetic Analyzer de Applied Biosystems® con software de recolección de datos, Versión 3.0 28

6. Análisis de datos 31
   A. Cómo importar archivos de texto de paneles, intervalos y repeticiones de PowerPlex® Fusion con el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 1.2 31
   B. Cómo importar el CC5 ILS 500 IDX Size Standard en el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 1.2 31
   C. Cómo crear un estándar de tamaño con el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 1.2 33
   D. Cómo crear un método de análisis de casos con el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 1.2 35
   E. Cómo crear una base de datos o método de análisis de paternidad con el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 1.2 39
   F. Cómo importar archivos de texto de paneles, intervalos y repeticiones de PowerPlex® Fusion con el software GeneMapper® *ID*, Versión 3.2 43
   G. Cómo importar el CC5 ILS 500 Size Standard en el software GeneMapper® *ID*, Versión 3.2 44
   H. Cómo crear un estándar de tamaño con el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 3.2 45
   I . Cómo crear un método de análisis de casos con el software GeneMapper® *ID*, Versión 3.2 48
   J. Cómo crear una base de datos o método de análisis de paternidad con el software GeneMapper® *ID*, Versión 3.2 50
   K. Controles 52
   L. Resultados 53

7. Resolución de problemas.....56
A. Amplificación y detección de fragmentos.....58
B. Amplificación de ADN extraído.....58
C. Amplificación directa de ADN de los perforadores de tarjetas de almacenamiento.....59
D. Amplificación directa de ADN de los hisopos.....61
E. Software GeneMapper® *ID-X*.....63
F. Software GeneMapper® *ID*.....65

8. Referencias.....68

9. Apéndice.....69
A. Ventajas de utilizar los locus en el PowerPlex® Fusion System.....69
B. Métodos de extracción y cuantificación de ADN, y apoyo de automatización.....73
C. El CC5 Internal Lane Standard 500.....74
D. Composición de buffers y soluciones.....75
E. Productos relacionados.....75

1. Descripción

Los locus de las repeticiones cortas en tándem (STR) consisten en elementos de secuencia breve y repetitiva de pares de bases de 3–7 de largo (1–4). Estas repeticiones están bien distribuidas en todo el genoma humano y son una fuente rica de marcadores altamente polimórficos que se pueden detectar utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (5–9). Los alelos de los locus de las STR se diferencian por el número de copias de la secuencia repetida que contiene la región amplificada, y se distinguen entre sí mediante la detección por fluorescencia seguida de la separación electroforética.

El PowerPlex® Fusion System[a–h] es un multiplex de 24 locus para las aplicaciones de identificación humana, incluido el análisis forense, las pruebas de parentesco y el uso en investigación. El sistema de cinco colores permite la coamplificación y la detección por fluorescencia de los locus de CODIS (EE. UU.) de 13 núcleos (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 y D21S11), los locus de la Norma europea de 12 núcleos (TH01, vWA, FGA, D21S11, D3S1358, D8S1179, D18S51, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 y D12S391) y de amelogenina para determinación del género. Además, el locus DYS391 específicos para sexo masculino se incluye para identificar los resultados nulos de alelos Y para amelogenina. Los locus Penta D y Penta E se incluyen para aumentar la discriminación y permitir la búsqueda de bases de datos que incluyen perfiles con estos locus Penta. Finalmente, los locus D2S1338 y D19S433, que son locus populares incluidos en una serie de bases de datos, se incorporaron para aumentar más la potencia de discriminación. Este panel ampliado de marcadores STR está previsto para satisfacer las recomendaciones tanto de CODIS como de ESS.

El PowerPlex® Fusion System es compatible con los ABI PRISM® 3100 y 3100-*Avant* Genetic Analyzers, y los 3130, 3130*xl*, 3500 y 3500xL Genetic Analyzers de Applied Biosystems®. Los instrumentos de amplificación y detección pueden variar. Es posible que deba optimizar protocolos, incluida la cantidad de ADN de plantilla, el número de ciclos, las condiciones de inyección y de volumen de carga para la instrumentación de su laboratorio. Debe realizarse una validación interna.

El PowerPlex® Fusion System proporciona todos los materiales necesarios para amplificar las regiones de las STR del ADN genómico humano, incluida una polimerasa de ADN termoestable de arranque en caliente, que es un componente de la mezcla maestra PowerPlex® Fusion 5X Master Mix. Este manual contiene protocolos para el uso del PowerPlex® Fusion System con el termociclador GeneAmp® PCR system 9700 además de los protocolos para separar los productos amplificados y detectar el material separado (figura 1). Los protocolos para operar los instrumentos de detección por fluorescencia se deben obtener del fabricante del instrumento.

Puede solicitar información sobre otros sistemas de STR fluorescentes a las oficinas de Promega o en línea en: **www.promega.com**

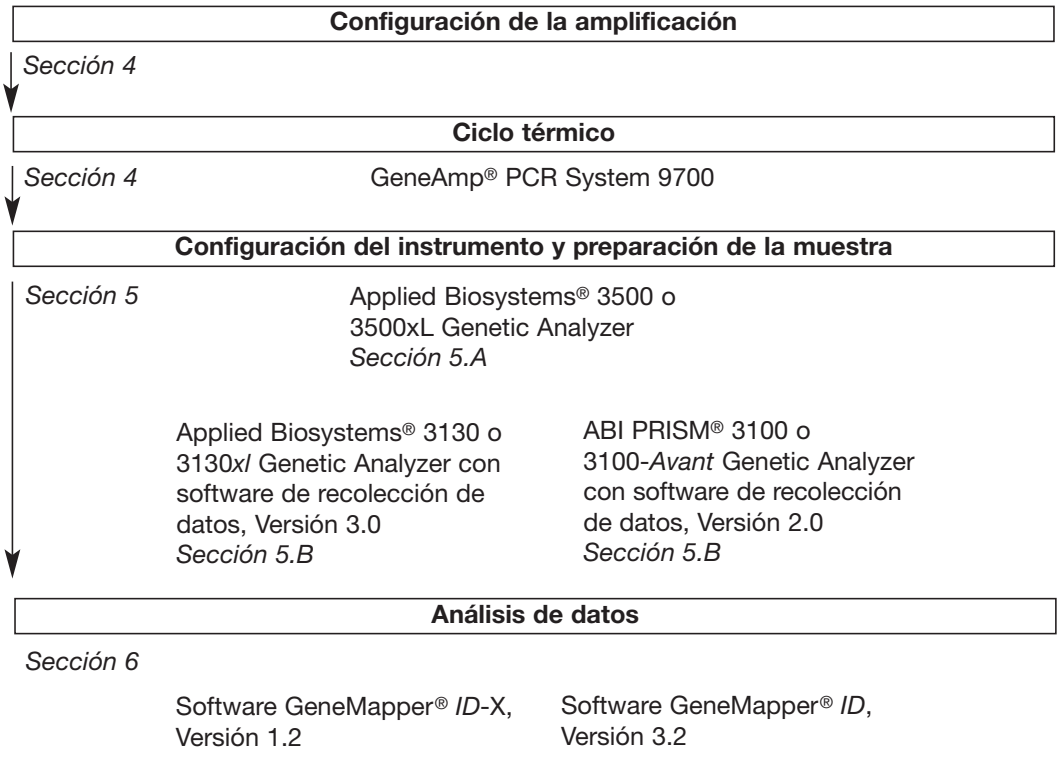
Configuración de la amplificación
Sección 4
Ciclo térmico
Sección 4
GeneAmp® PCR System 9700
Configuración del instrumento y preparación de la muestra
Sección 5
Applied Biosystems® 3500 o 3500xL Genetic Analyzer
Sección 5.A
Applied Biosystems® 3130 o 3130xl Genetic Analyzer con software de recolección de datos, Versión 3.0
Sección 5.B
ABI PRISM® 3100 o 3100-Avant Genetic Analyzer con software de recolección de datos, Versión 2.0
Sección 5.B
Análisis de datos
Sección 6
Software GeneMapper® ID-X, Versión 1.2
Software GeneMapper® ID, Versión 3.2

Figura 1. Una descripción general del protocolo del PowerPlex® Fusion System.

2. Componentes del producto y condiciones de almacenamiento

Producto	Tamaño	Nro. de Cat.
PowerPlex® Fusion System	200 reactivos	DC2402

No debe ser utilizado para diagnóstico médico. Este sistema contiene los reactivos necesarios para 200 reacciones de 25 µl cada una. Incluye:

Caja de componentes anteriores a la amplificación

1 ml	PowerPlex® Fusion 5X Master Mix
1 ml	PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix
25 µl	ADN de control 2800M, 10 ng/µl
5 × 1250 µl	Agua, grado de amplificación

Caja de componentes posteriores a la amplificación

100 µl	PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix
2 × 300 µl	CC5 Internal Lane Standard 500

Producto	Tamaño	Nro. de Cat.
PowerPlex® Fusion System	800 reactivos	DC2408

No debe ser utilizado para diagnóstico médico. Este sistema contiene los reactivos necesarios para 800 reacciones de 25 µl cada una. Incluye:

Caja de componentes anteriores a la amplificación

4 × 1 ml	PowerPlex® Fusion 5X Master Mix
4 × 1 ml	PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix
25 µl	ADN de control 2800M, 10 ng/µl
10 × 1250 µl	Agua, grado de amplificación

Caja de componentes posteriores a la amplificación

4 × 100 µl	PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix
8 × 300 µl	CC5 Internal Lane Standard 500

El componente PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix viene en una bolsa sellada y separada para el envío. Este componente debe ser trasladado a la caja posterior a la amplificación después de abrirlo. El agua, grado de amplificación, se proporciona en una bolsa sellada y separada para el envío. Este componente debe ser trasladado a la caja anterior a la amplificación después de abrirlo.

Condiciones de almacenamiento: Para el almacenamiento a largo plazo, guarde todos los componentes excepto el ADN de control 2800M a una temperatura de –30 °C a –10 °C en un congelador antiescarcha. Almacene el ADN de control 2800M a una temperatura de 2–10 °C. Para uso diario, los componentes del PowerPlex® Fusion System se pueden almacenar hasta 1 semana a 2–10 °C. Los productos PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix, PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix y CC5 Internal Lane Standard 500 (CC5 ILS 500) son sensibles a la luz y se deben almacenar en un sitio oscuro. Es altamente recomendable que los reactivos anteriores y posteriores a la amplificación se almacenen y se utilicen por separado con diferentes pipetas, gradillas de tubos, etc.

Disponibles por separado

Los archivos de texto de los paneles, intervalos y repeticiones adecuados para el software GeneMapper® *ID* y el *ID*-X están disponibles para su descarga en: **www.promega.com/resources/tools/genemapper-id-software-panels-and-bin-sets/**

Se requieren estándares para matrices para la configuración inicial de la matriz de separación de colores. Los estándares para matrices se suministran por separado y están disponibles para los ABI PRISM® 3100 y 3100-*Avant* Genetic Analyzers y los Applied Biosystems® 3130, 3130*xl*, 3500 y 3500xL Genetic Analyzers (PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130, No. de cat. DG4700).

3. Antes de comenzar

3.A. Precauciones

La aplicación de la tipificación en función de la PCR para casos forenses o casos de paternidad requiere estudios de validación y medidas de control de calidad que no están contenidas en este manual (10,11). Las pautas para el proceso de validación están publicadas en la *Validación interna del Manual de referencia de los sistemas de STR* (12).

La calidad del ADN purificado o las muestras de amplificación directa, los pequeños cambios en los buffers, la resistencia iónica, las concentraciones de imprimación, el volumen de reacción, la elección de termociclador y las condiciones de ciclo térmico pueden incidir en el éxito de la PCR. Sugerimos una estricta observancia de los procedimientos recomendados para la amplificación y la detección por fluorescencia. Se requieren investigación y validación adicionales si se realiza cualquier modificación a los protocolos recomendados.

El análisis de las STR en función de la PCR puede resultar contaminado por cantidades muy pequeñas de ADN humano. Debe tenerse extremo cuidado para evitar la contaminación cruzada cuando se prepara una muestra de ADN, se manipulan pares de imprimación, se reúnen reacciones de amplificación y se analizan productos de amplificación. Los reactivos y los materiales utilizados antes de la amplificación (PowerPlex® Fusion 5X Master Mix, PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix, ADN de control 2800M y agua, grado de amplificación) se proporcionan en una caja separada y se deben almacenar separados de aquellos materiales que se utilizan después de la amplificación (PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix y CC5 Internal Lane Standard 500). Incluya siempre una reacción de control negativo (por ej., sin plantilla) para detectar la contaminación de los reactivos. Es altamente recomendable el uso de guantes y puntas para pipetas resistentes al aerosol (por ej., puntas ART®, sección 9.E).

Algunos reactivos utilizados en el análisis de productos de las STR son potencialmente peligrosos y se deben manejar de manera acorde. La formamida es un agente irritante y teratógeno, evite la inhalación y el contacto con la piel. Lea la etiqueta de advertencia y tome las precauciones apropiadas cuando maneje esta sustancia. Use siempre guantes y anteojos de seguridad cuando trabaje con formamida.

3.B. Calibración espectral

La generación correcta de un archivo de matriz es fundamental para evaluar los sistemas multicolores con los ABI PRISM® 3100 y 3100-*Avant* Genetic Analyzers y los Applied Biosystems® 3130, 3130*xl*, 3500 y 3500xL Genetic Analyzers. Se debe generar una matriz para cada instrumento individual.

Para obtener los protocolos e información adicional sobre la calibración espectral en estos instrumentos, consulte el boletín técnico *PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130.* #TBD024. Este manual está disponible en línea en: **www.promega.com/protocols/**

4. Protocolos para la amplificación del ADN al utilizar el PowerPlex® Fusion System

El PowerPlex® Fusion System se desarrolló para amplificación de ADN extraído y de muestras de amplificación directa. Se recomiendan variaciones leves del protocolo para un rendimiento óptimo para cada fuente de plantilla. Los protocolos para amplificación que usan ADN extraído (Sección 4.A), perforadores de tarjetas de almacenamiento FTA® y no FTA (Sección 4.B) e hisopos (Sección 4.C) se incluyen en las siguientes secciones de amplificación.

El PowerPlex® Fusion System está optimizado para el termociclador GeneAmp® PCR System 9700.

Es altamente recomendable el uso de guantes y puntas para pipetas resistentes al aerosol para evitar la contaminación cruzada. Mantenga todos los reactivos anteriores a la amplificación y posteriores a la amplificación en habitaciones separadas. Prepare las reacciones de amplificación en una habitación dedicada a la configuración de la reacción. Utilice equipo y suministros dedicados a la configuración de la reacción.

Se debe dedicar un cuidado minucioso para asegurar que la amplificación se realice correctamente. Se proporciona una pauta para la resolución de problemas de amplificación en la sección 7.

La concentración del ADN de control de 2800 M se determinó midiendo la absorbencia a 260 nm. La cuantificación de este ADN de control por otros métodos, como por ejemplo qPCR, puede dar como resultado un valor diferente. Prepare una dilución nueva de ADN para cada conjunto de amplificaciones. No almacene ADN diluido (por ej., 0,25 ng/µl o menos).

4.A. Amplificación de ADN extraído

Materiales que deberá suministrar el usuario

- termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- microcentrifugadora
- placa óptica de reacción de 96 pocillos MicroAmp® o tubos de reacción de 0,2 ml MicroAmp® (Applied Biosystems)
- puntas para pipetas resistentes al aerosol (consulte la sección 9.E)

Amplificamos de manera rutinaria 0,25–0,5 ng de plantilla de ADN en un volumen de reacción de 25 µl utilizando el protocolo que se detalla abajo.

Configuración de la amplificación

1. Descongele por completo la mezcla maestra PowerPlex® Fusion 5X Master Mix, la mezcla para par de imprimación PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix y el agua, grado de amplificación.

   Nota: Centrifugue brevemente los tubos para que el contenido se desplace hacia el fondo, luego agite los reactivos durante 15 segundos antes de cada uso. No centrifugue la 5X Primer Pair Mix o 5X Master Mix después de agitar, ya que esto puede provocar que los reactivos se concentren en el fondo del tubo.

2. Determine el número de reacciones que se configurarán. Este número debe incluir las reacciones de control positivo y negativo. Agregue 1 o 2 reacciones a este número para compensar el error de pipeteado. Si bien este enfoque consume una pequeña cantidad de cada reactivo, asegura que usted tenga suficiente mezcla de amplificación de la PCR para todas las muestras. Además, garantiza que cada reacción contenga la misma mezcla de amplificación de la PCR.

3. Utilice una placa limpia MicroAmp® para reunir la reacción y etiquete de forma apropiada o, como alternativa, determine el número de tubos de reacción de 0,2 ml limpios requeridos, y etiquete de forma apropiada.

4. Agregue el volumen final de cada reactivo enumerado en la Tabla 1 a un tubo estéril.

Tabla 1. Mezcla de amplificación de la PCR para la amplificación del ADN extraído.

Componente de la mezcla de amplificación de la PCR[1]	Volumen por reacción	×	Número de reacciones	=	Volumen final (µl)
Agua, grado de amplificación[1]	hasta un volumen final de 25,0 µl	×		=	
PowerPlex® Fusion 5X Master Mix	5,0 µl	×		=	
PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix	5,0 µl	×		=	
plantilla de ADN (0,25–0,5ng)[2,3]	hasta 15 µl				
volumen total de la reacción	25 µl				

[1]Agregue agua, grado de amplificación, al primer tubo, luego agregue la PowerPlex® Fusion 5X Master Mix y la PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix. La plantilla de ADN se agregará en el paso 6.

[2]Almacene las plantillas de ADN en un buffer TE^{-4} (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,1 mM EDTA) o buffer TE^{-4} con 20 µg/ml de glucógeno. Si la plantilla de ADN está almacenada en un buffer TE que no tiene pH 8,0 o contiene una concentración de EDTA más alta, el volumen de ADN agregado no debe superar el 20% del volumen total de la reacción. La eficiencia y la calidad de la amplificación de la PCR pueden ser ampliamente alteradas por los cambios en el pH (debido al Tris-HCl agregado), la concentración de magnesio disponible (debido a la quelación provocada por el EDTA) u otros inhibidores de la PCR, que pueden estar presentes en bajas concentraciones que dependen de la fuente de la plantilla de ADN y del procedimiento de extracción utilizado.

[3]Las concentraciones de ADN aparente pueden diferir, y dependen del método de cuantificación de ADN utilizado (13). La cantidad de la plantilla de ADN recomendada aquí está basada en las concentraciones de ADN determinadas al medir la absorbancia a 260 nm. Recomendamos firmemente que realice experimentos para determinar la cantidad óptima de ADN de acuerdo con su método de cuantificación de ADN.

4.A. Amplificación de ADN extraído (continuación)

5. Agite la mezcla de amplificación de la PCR durante 5–10 segundos, luego agregue la mezcla de amplificación de la PCR a cada pocillo de la reacción.

Si no se agita lo suficiente la mezcla de amplificación de la PCR, puede provocar una amplificación escasa o falta de equilibrio entre locus.

6. Agregue la plantilla de ADN (0,25–0,5 ng) para cada muestra al pocillo respectivo con la mezcla de amplificación de la PCR.

7. Para el control positivo de la amplificación, agite el tubo de ADN de control 2800M, luego diluya una alícuota hasta 0,5 ng en el volumen de plantilla de ADN deseado. Agregue 0,5 ng de ADN diluido a un pocillo de reacción con la mezcla de amplificación de la PCR.

8. Para el control negativo de amplificación, pipetee agua, grado de amplificación, o buffer TE^{-4}, en vez de la plantilla de ADN, en el pocillo de reacción que contiene una mezcla de amplificación de PCR.

9. Selle la placa o cierre los tubos. **Opcional:** Centrifugue brevemente la placa para llevar el contenido hasta el fondo de los pocillos y retire cualquier burbuja de aire.

Ciclo térmico

Los instrumentos de amplificación y detección pueden variar. Es posible que deba optimizar protocolos, incluida la cantidad de ADN de plantilla, el número de ciclos, las condiciones de inyección y de volumen de carga para la instrumentación de su laboratorio. Las pruebas realizadas en Promega demuestran que 30 ciclos funcionan bien para 0,5 ng de plantillas de ADN purificadas.

1. Coloque una placa o tubos de reacción MicroAmp® en el termociclador.

2. Seleccione y ejecute el protocolo recomendado. Asegúrese de haber seleccionado el modo Max (Máx.) como la velocidad de rampa. El protocolo preferido para utilizar con el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 se proporciona abajo. El tiempo de ciclo total estimado es 1,5 horas.

Protocolo del ciclo térmico[1]
96 °C durante 1 minutos, luego: 94 °C durante 10 segundos 59 °C durante 1 minutos
72 °C durante 30 segundos para 30 ciclos, luego: 60 °C durante 10 minutos inmersión a 4 °C

[1]Cuando utilice el termociclador del GeneAmp® PCR System 9700, el programa se debe ejecutar con la velocidad de rampa configurada en el modo máximo. (Esto requiere un bloque de muestra de plata o plata dorada). La velocidad de la rampa se configura después de que comienza la ejecución del ciclo térmico. Aparece la pantalla "Select Method Options" (Seleccionar opciones de método). Seleccione "Max" (Máximo) para la velocidad de la rampa, e ingrese el volumen de la reacción.

3. Después de finalizado el protocolo del ciclo térmico, almacene las muestras amplificadas a –20 °C en una caja protegida de la luz.

   Nota: El almacenamiento a largo plazo de las muestras amplificadas a 4 °C o más puede producir artefactos.

4.B. Amplificación directa de ADN de los perforadores de tarjetas de almacenamiento

Materiales que deberá suministrar el usuario

- termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- microcentrifugadora
- placa óptica de reacción de 96 pocillos MicroAmp® o tubos de reacción de 0,2 ml MicroAmp® (Applied Biosystems)
- puntas para pipetas resistentes al aerosol (consulte la sección 9.E)
- PunchSolution™ Kit (Nro. de cat. DC9271) para perforadores de tarjetas no FTA
- perforador Harris Micro-Punch de 1,2 mm o un perforador manual equivalente y soporte para cortar, o bien, un sistema de perforador automatizado

Esta sección contiene un protocolo para la amplificación directa de ADN de las tarjetas perforadas de almacenamiento utilizando el PowerPlex® Fusion System y el termociclador GeneAmp® PCR System 9700.

Recomendamos amplificar una o dos perforaciones de 1,2 mm de una tarjeta de almacenamiento que contiene una muestra bucal o una perforación de 1,2 mm de una tarjeta de almacenamiento que contiene una muestra de sangre entera en un volumen de reacción de 25 µl utilizando los protocolos que se detallan abajo. El PowerPlex® Fusion System está optimizado para el termociclador GeneAmp® PCR System 9700.

Nota: Deberá optimizar y validar el número de perforaciones de tarjetas de almacenamiento por reacción en su laboratorio. Vea las recomendaciones de optimización de PCR al final de la sección.

Los tipos de muestras en soporte FTA® incluyen:

- Células bucales recolectadas en las tarjetas FTA® con dispositivos Whatman EasiCollect™ o Fitzco Sampact™
- Células bucales recolectadas con hisopos estériles y transferidas a tarjetas FTA® o tarjetas que indican FTA®
- Sangre líquida (proveniente de los tubos Vacutainer® de recolección o almacenamiento o pinchazos en los dedos) almacenada en las tarjetas FTA®

Los tipos de muestras que no son FTA incluyen:

- Muestras bucales en dispositivos Bode Buccal DNA Collector™
- Muestras de sangre y bucales en perforaciones de tarjetas no FTA (por ejemplo, S&S 903)

4.B Amplificación directa de ADN de las tarjetas perforadas de almacenamiento (continuación)

Trate preliminarmente tipos de muestras no FTA con el PunchSolution™ Kit (Nro. de cat. DC9271) para lisar muestras no FTA antes de agregar la mezcla de amplificación PCR. Para obtener más información, consulte el Manual técnico Nro. TMD038 del *PunchSolution™ Kit*. Al no tratar preliminarmente estas muestras, se pueden obtener perfiles incompletos.

Utilice una herramienta de perforación manual con una punta de 1,2 mm para crear manualmente discos de muestra desde una tarjeta de almacenamiento. Coloque la punta cerca del centro del lugar de la muestra y, con una acción de torsión o presión, corte un disco de muestra de 1,2 mm. Utilice el émbolo para expulsar el disco en el pocillo apropiado de una placa de reacción.

También se pueden utilizar perforadoras automáticas para crear discos de muestra. Consulte la guía de usuario de su instrumento con el fin de obtener asistencia con generación de discos de 1,2 mm, consejos técnicos e información sobre resolución de problemas.

Nota: La estática puede ser problemática a la hora de agregar una perforación a un pocillo. Para perforaciones de tarjetas FTA®, agregar la mezcla de amplificación de la PCR al pocillo antes de agregar la perforación puede aliviar los problemas de estática. Para perforaciones de tarjetas no FTA, agregar PunchSolution™ Reagent al pocillo antes de agregar la perforación durante el tratamiento preliminar puede aliviar los problemas de estática.

Configuración de la amplificación

1. Descongele por completo la mezcla maestra PowerPlex® Fusion 5X Master Mix, la mezcla para par de imprimación PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix y el agua, grado de amplificación.

   Nota: Centrifugue brevemente los tubos para que el contenido se desplace hacia el fondo, luego agite los reactivos durante 15 segundos antes de cada uso. No centrifugue la 5X Primer Pair Mix o 5X Master Mix después de agitar, ya que esto puede provocar que los reactivos se concentren en el fondo del tubo.

2. Determine el número de reacciones que se configurarán. Este número debe incluir las reacciones de control positivo y negativo. Agregue 1 o 2 reacciones a este número para compensar el error de pipeteado. Si bien este enfoque consume una pequeña cantidad de cada reactivo, asegura que usted tenga suficiente mezcla de amplificación de la PCR para todas las muestras. Además, garantiza que cada reacción contenga la misma mezcla de amplificación de la PCR.

3. Utilice una placa limpia MicroAmp® para reunir la reacción y etiquete de forma apropiada o, como alternativa, determine el número de tubos de reacción de 0,2 ml limpios requeridos, y etiquete de forma apropiada.

4. Agregue el volumen final de cada reactivo enumerado en la Tabla 2 a un tubo estéril.

Tabla 2. Mezcla de amplificación de la PCR para amplificación directa de ADN de las tarjetas perforadas de almacenamiento.

Componente de la mezcla de amplificación de la PCR[1]	Volumen por reacción	×	Número de reacciones	=	Volumen final
Agua, grado de amplificación	15 µl	×		=	
PowerPlex® Fusion 5X Master Mix	5,0 µl	×		=	
PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix	5,0 µl	×		=	
volumen total de la reacción	25 µl				

[1]Agregue agua, grado de amplificación, al primer tubo, luego agregue la PowerPlex® Fusion 5X Master Mix y la PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix. Para perforaciones de tarjeta FTA®, la plantilla de ADN se agregará en el paso 6.

5. Agite la mezcla de amplificación de la PCR durante 5–10 segundos, luego pipetee 25 µl de la mezcla de amplificación de la PCR en cada pocillo de reacción.

Si no se agita lo suficiente la mezcla de amplificación de la PCR, puede provocar una amplificación escasa o falta de equilibrio entre locus.

6. Para tarjetas de almacenamiento FTA®, agregue una o dos perforaciones de 1,2 mm de una tarjeta que contenga una muestra bucal o una perforación de 1,2 mm de una tarjeta que contenga una muestra de sangre entera a los pocillos apropiados de la placa de reacción. Para perforaciones de tarjetas no FTA, agregue la mezcla de amplificación PCR a las perforaciones tratadas preliminarmente con PunchSolution™.

   Nota: También es aceptable agregar primero la perforación de la tarjeta FTA®, luego agregue la mezcla de amplificación de PCR.

7. Para el control positivo de amplificación, agregue 1 µl de ADN de control 2800M (10 ng) a un pocillo de reacción con 25 µl de mezcla de amplificación de la PCR.

   Notas:

   1. No incluya perforaciones de tarjetas de almacenamiento en blanco en las reacciones de control positivo.
   2. Puede ser necesaria la optimización de la cantidad de ADN de control, según las condiciones del ciclo y las preferencias del laboratorio.

8. Reserve un pocillo que contenga mezcla de amplificación de la PCR como control negativo de amplificación.

   Nota: Se puede realizar un control negativo adicional con una perforación en blanco para detectar la contaminación de la tarjeta de almacenamiento o dispositivo perforador.

4.B Amplificación directa de ADN de las tarjetas perforadas de almacenamiento (continuación)

9. Selle la placa y centrifúguela brevemente para que las perforaciones de la tarjeta de almacenamiento se desplacen hacia el fondo de los pocillos.

Ciclo térmico

Los instrumentos de amplificación y detección pueden variar. Deberá optimizar protocolos, incluida la cantidad de perforaciones de la tarjeta de almacenamiento, el número de ciclos (25–28 ciclos), el tiempo de inyección y el volumen de carga para la instrumentación de su laboratorio. Las pruebas efectuadas en Promega Corporation demuestran que 27 ciclos funcionan bien para una variedad de tipos de muestra. Las muestras bucales pueden requerir más ciclos de amplificación que las muestras de sangre. Se debería optimizar el número de ciclos en cada laboratorio para cada tipo de muestra que se amplifique.

1. Coloque la placa MicroAmp® en el termociclador.
2. Seleccione y ejecute el protocolo recomendado. Asegúrese de haber seleccionado el modo Max (Máx.) como la velocidad de rampa. El protocolo preferido para utilizar con el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 se proporciona abajo. El tiempo de ciclo total estimado es 1,5 horas.

Protocolo del ciclo térmico[1]
96 °C durante 1 minuto, luego:
94 °C durante 10 segundos 59 °C durante 1 minutos 72 °C durante 30 segundos para 27 ciclos, luego:
60 °C durante 20 minutos
inmersión a 4 °C

[1]Cuando utilice el termociclador del GeneAmp® PCR System 9700, el programa se debe ejecutar con la velocidad de rampa configurada en el modo máximo. (Esto requiere un bloque de muestra de plata o plata dorada). La velocidad de la rampa se configura después de que comienza la ejecución del ciclo térmico. Aparece la pantalla "Select Method Options" (Seleccionar opciones de método). Seleccione "Max" (Máximo) para la velocidad de la rampa, e ingrese el volumen de la reacción.

Nota: La extensión final para amplificación directa se amplió a 20 minutos comparada con 10 minutos para el protocolo de ADN extraído, con el fin de permitir suficiente tiempo para la adenilación de grandes cantidades de amplicón.

3. Después de finalizado el protocolo del ciclo térmico, almacene las muestras amplificadas a –20 °C en una caja protegida de la luz.

   Nota: El almacenamiento a largo plazo de las muestras amplificadas a 4 °C o más puede producir artefactos.

Optimización de la PCR

El número de ciclos se debe optimizar en función de los resultados de un experimento inicial para determinar la sensibilidad con su método de recolección, tipos de muestras, número de perforaciones e instrumentos.

1. Elija varias muestras que representen tipos de muestras típicas que encuentra en el laboratorio. Prepárelas como lo haría habitualmente con su proceso de trabajo normal.
2. Según su protocolo preferido, coloque una o dos perforaciones de tarjeta de almacenamiento de 1,2 mm que contengan una muestra bucal o una perforación de 1,2 mm de una tarjeta de almacenamiento que contenga sangre entera en cada pocillo de una placa de reacción. Asegúrese de tratar preliminarmente las muestras no FTA con el PunchSolution™ Kit (Nro. de cat. DC9271).
3. Prepare cuatro placas de reacción idénticas con perforaciones de las mismas muestras.
4. Amplifique muestras utilizando el protocolo de ciclo térmico proporcionado anteriormente, pero someta cada placa a un número de ciclos diferente (25–28 ciclos).
5. Después de la amplificación, utilice los protocolos de separación y detección validados del laboratorio para determinar el número óptimo de ciclos para el tipo de muestra y el número de perforaciones de tarjetas de almacenamiento.

4.C. Amplificación directa de ADN de los hisopos

Materiales que deberá suministrar el usuario

- termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- microcentrifugadora
- placa óptica de reacción de 96 pocillos MicroAmp® o tubos de reacción de 0,2 ml MicroAmp® (Applied Biosystems)
- puntas para pipetas resistentes al aerosol (consulte la sección 9.E)
- SwabSolution™ Kit (Nro. de cat. DC8271)

Esta sección contiene un protocolo para la amplificación de ADN a partir de extractos de hisopos al emplear el PowerPlex® Fusion System y el termociclador GeneAmp® PCR System 9700.

Trate preliminarmente el OmniSwab™ (GE Healthcare) o los hisopos de algodón con la SwabSolution™ Kit (Nro. de cat. DC8271) según se describe en el Manual técnico Nro. TMD037 del *SwabSolution™ Kit* para generar un extracto de hisopo.

4.C. Amplificación directa de ADN de los hisopos (continuación)

Configuración de la amplificación

1. Descongele por completo la mezcla maestra PowerPlex® Fusion 5X Master Mix, la mezcla para par de imprimación PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix y el agua, grado de amplificación.

   Nota: Centrifugue brevemente los tubos para que el contenido se desplace hacia el fondo, luego agite los reactivos durante 15 segundos antes de cada uso. No centrifugue la 5X Primer Pair Mix o 5X Master Mix después de agitar, ya que esto puede provocar que los reactivos se concentren en el fondo del tubo.

2. Determine el número de reacciones que se configurarán. Este número debe incluir las reacciones de control positivo y negativo. Agregue 1 o 2 reacciones a este número para compensar el error de pipeteado. Si bien este enfoque consume una pequeña cantidad de cada reactivo, asegura que usted tenga suficiente mezcla de amplificación de la PCR para todas las muestras. Además, garantiza que cada reacción contenga la misma mezcla de amplificación de la PCR.

3. Utilice una placa limpia MicroAmp® para reunir la reacción y etiquete de forma apropiada.

4. Agregue el volumen final de cada reactivo enumerado en la Tabla 3 a un tubo estéril.

Tabla 3. Mezcla de amplificación de la PCR para amplificación directa de ADN de los hisopos.

Componente de la mezcla de amplificación de la PCR[1]	Volumen por reacción	×	Número de reacciones	=	Volumen final
Agua, grado de amplificación	13 µl	×		=	
PowerPlex® Fusion 5X Master Mix	5,0 µl	×		=	
PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix	5,0 µl	×		=	
Extracto del hisopo	2,0 µl				
volumen total de la reacción	25 µl				

[1]Agregue agua, grado de amplificación, al primer tubo, luego agregue la PowerPlex® Fusion 5X Master Mix y la PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix. El extracto del hisopo se agregará en el paso 6.

5. Agite la mezcla de amplificación de la PCR durante 5–10 segundos, luego pipetee 23 µl de la mezcla de amplificación de la PCR en cada pocillo de reacción.

Si no se agita lo suficiente la mezcla de amplificación de la PCR, puede provocar una amplificación escasa o falta de equilibrio entre locus.

6. Pipetee 2,0 µl del extracto de hisopo para cada muestra en el pocillo apropiado de la placa de reacción.

7. Para el control positivo de amplificación, agite el tubo del ADN de control 2800M, luego diluya una alícuota hasta 5,0 ng/µl. Agregue 2 µl (10 ng) a un pocillo de reacción que contenga 23 µl de mezcla de amplificación de la PCR.

8. Para el control negativo de amplificación, pipetee 2,0 µl de agua, grado de amplificación, o buffer TE^{-4}, en vez del extracto de hisopo en un pocillo de reacción que contenga la mezcla de amplificación de PCR.

9. Selle la placa. **Opcional:** Centrifugue brevemente la placa para llevar el contenido hasta el fondo de los pocillos y retire cualquier burbuja de aire.

Ciclo térmico

Los instrumentos de amplificación y detección pueden variar. Deberá optimizar protocolos, incluida la cantidad de ADN de plantilla, el número de ciclos (25–28 ciclos), el tiempo de inyección y el volumen de carga para la instrumentación de su laboratorio. Las pruebas efectuadas en Promega demuestran que 27 ciclos funcionan bien para una variedad de tipos de muestra. Se deberá optimizar el número de ciclos en cada laboratorio para cada tipo de muestra que se amplifique.

1. Coloque la placa MicroAmp® en el termociclador.

2. Seleccione y ejecute el protocolo recomendado. Asegúrese de haber seleccionado el modo Max (Máx.) como la velocidad de rampa. El protocolo preferido para utilizar con el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 se proporciona abajo. El tiempo de ciclo total estimado es 1,5 horas.

Protocolo del ciclo térmico[1]
96 °C durante 1 minuto, luego:
94 °C durante 10 segundos 59 °C durante 1 minuto 72 °C durante 30 segundos para 27 ciclos, luego:
60 °C durante 20 minutos
inmersión a 4 °C

[1]Cuando utilice el termociclador del GeneAmp® PCR System 9700, el programa se debe ejecutar con la velocidad de rampa configurada en el modo máximo. (Esto requiere un bloque de muestra de plata o plata dorada). La velocidad de la rampa se configura después de que comienza la ejecución del ciclo térmico. Aparece la pantalla "Select Method Options" (Seleccionar opciones de método). Seleccione "Max" (Máximo) para la velocidad de la rampa e ingrese el volumen de la reacción.

Nota: La extensión final para amplificación directa se amplió a 20 minutos comparada con 10 minutos para el protocolo de ADN extraído, con el fin de permitir suficiente tiempo para la adenilación de grandes cantidades de amplicón.

3. Después de finalizado el protocolo del ciclo térmico, almacene las muestras amplificadas a –20 °C en una caja protegida de la luz.

   Nota: El almacenamiento a largo plazo de las muestras amplificadas a 4 °C o más puede producir artefactos.

4.C. Amplificación directa de ADN de los hisopos (continuación)

Optimización de la PCR

El número de ciclos se debe optimizar en función de los resultados de un experimento inicial para determinar la sensibilidad con su método de recolección, tipos de muestras e instrumentos.

1. Elija varias muestras que representen tipos de muestras típicas que encuentra en el laboratorio. Prepárelas como lo haría habitualmente con su proceso de trabajo normal.
2. Prepare cuatro placas de reacción idénticas con alícuotas de los mismos extractos de hisopos.
3. Amplifique muestras utilizando el protocolo de ciclo térmico proporcionado anteriormente, pero someta cada placa a un número de ciclos diferente (25–28 ciclos).
4. Después de la amplificación, utilice los protocolos de separación y detección validados del laboratorio para determinar el número óptimo de ciclos para cada tipo de muestra.

5. Configuración del instrumento y preparación de la muestra

5.A. Detección de fragmentos amplificados al utilizar el 3500 o el 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems®

Materiales que deberá suministrar el usuario

- calentador en seco de 95 °C, baño de agua o termociclador
- hielo picado o baño de hielo
- centrifugador compatible con placas de 96 pocillos
- puntas para pipetas resistentes al aerosol
- serie capilar de 3500/3500xL, 36 cm
- retén de 96 pocillos y conjunto de base (Estándar) (Applied Biosystems N.º de Cat. 4410228)
- polímero POP-4™ en una bolsa para el 3500 o el 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems®
- recipiente de buffer de ánodo
- recipiente de buffer de cátodo
- placa óptica de 96 pocillos y septa MicroAmp®, o equivalente
- formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems Nro. de Cat. 4311320)

La calidad de la formamida es fundamental. Use formamida Hi-Di™. Congele la formamida en alícuotas a –20 °C. Los múltiples ciclos de congelación/descongelación o el almacenamiento a largo plazo a 4 °C pueden provocar la descomposición de la formamida. La formamida de mala calidad puede contener iones que compitan con el ADN durante la inyección, lo que provoca alturas de pico inferiores y sensibilidad reducida. Un mayor tiempo de inyección no puede aumentar la señal.

La formamida es un agente irritante y teratógeno, evite la inhalación y el contacto con la piel. Lea la etiqueta de advertencia y tome las precauciones apropiadas cuando maneje esta sustancia. Use siempre guantes y anteojos de seguridad cuando trabaje con formamida.

Preparación de la muestra

1. Descongele el CC5 Internal Lane Standard 500.

   Nota: Centrifugue brevemente el tubo para que el contenido se desplace hacia el fondo, luego agite durante 15 segundos antes de cada uso. No centrifugue después de agitar, ya que esto puede provocar que el estándar de tamaño se concentre en el fondo del tubo.

2. Prepare un cóctel de carga combinando y mezclando el estándar de carril interno CC5 Internal Lane Standard 500 y la formamida Hi-Di™ de la siguiente manera:

   [(1,0 µl CC5 ILS 500) × (Nro. de muestras)] + [(10,0 µl de formamida Hi-Di™) × (Nro. de muestras)]

   Nota: El volumen del estándar de carril interno utilizado en el cóctel de carga puede ser aumentado o disminuido para ajustar la intensidad de los picos de estándar de tamaño, según las preferencias del laboratorio. Mantenga el volumen de la formamida a 10,0 µl y ajuste el volumen agregado a los pocillos en el paso 4 de manera acorde.

3. Agite durante 10–15 segundos para mezclar.

4. Pipetee 11 µl de formamida/mezcla de estándar de carril interno en cada pocillo.

5. Agregue 1 µl de muestra amplificada (o 1 µl de PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix). Cubra los pocillos con la septa apropiada.

   Nota: Los límites de detección del instrumento varían, por lo tanto, el tiempo de inyección, el voltaje de inyección o la cantidad de muestra mezclada con el cóctel de carga pueden necesitar ser aumentados o disminuidos. Para modificar el tiempo de inyección o el voltaje de inyección en el módulo de ejecución, seleccione "Instrument Protocol" (Protocolo de instrumentos) del menú Library (Biblioteca) en el software de recolección de datos. Si las alturas de picos son más elevadas que lo deseado, utilice menos plantilla de ADN en las reacciones de amplificación o reduzca el número de ciclos en el programa de amplificación para logar la intensidad de señal deseada. Si se reduce el tiempo o el voltaje de la inyección, se puede requerir un umbral de amplitud de pico reducido para el canal naranja, para un tamaño correcto.

6. Centrifugue brevemente la placa para eliminar las burbujas de aire de los pocillos.

7. Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos, luego enfríe de inmediato sobre hielo picado o en un baño de hielo durante 3 minutos. Desnaturalice las muestras justo antes de cargar el instrumento.

Preparación del instrumento

Consulte la Guía de usuarios del *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer* para el cronograma de mantenimiento del instrumento y las instrucciones para instalar la serie capilar, los buffers y la bolsa de polímero, y realizar la calibración espacial. Las muestras se pueden analizar como se describe en la Guía de usuarios del *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

1. Abra el software de recolección de datos 3500 Data Collection Software. Se iniciará la pantalla del tablero (figura 2). Asegúrese de que la información sobre los artículos de consumo y las notificaciones de mantenimiento sean aceptables.

   Configure la temperatura del horno a 60 °C, luego seleccione "Start Pre-Heat" (Comenzar precalentamiento) al menos 30 minutos antes de la primera inyección para precalentar el horno.

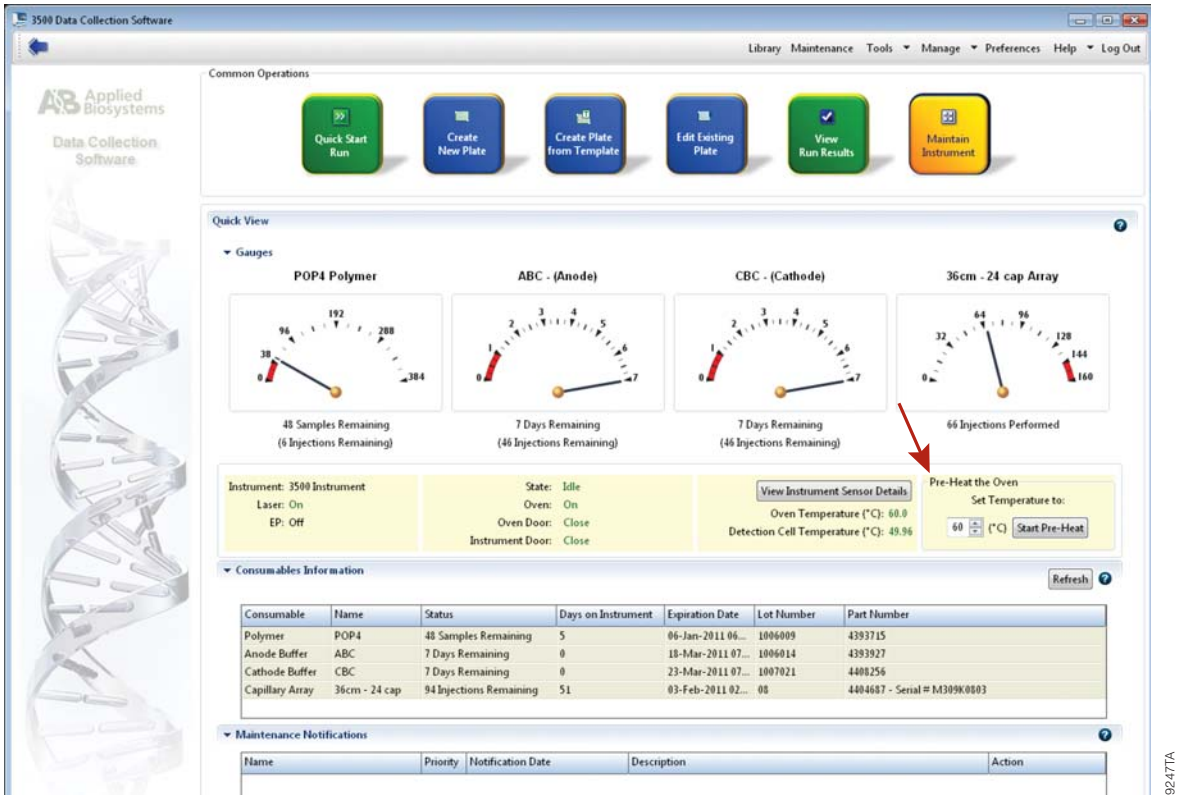
3500 Data Collection Software
Library Maintenance Tools Manage Preferences Help Log Out
Common Operations
Quick Start Run
Create New Plate
Create Plate from Template
Edit Existing Plate
View Run Results
Maintain Instrument
Quick View
Gauges
POP4 Polymer
ABC - (Anode)
CBC - (Cathode)
36cm - 24 cap Array
48 Samples Remaining
(6 Injections Remaining)
7 Days Remaining
(46 Injections Remaining)
7 Days Remaining
(46 Injections Remaining)
66 Injections Performed
Instrument: 3500 Instrument
Laser: On
EP: Off
State: Idle
Oven: On
Oven Door: Close
Instrument Door: Close
View Instrument Sensor Details
Oven Temperature (°C): 60.0
Detection Cell Temperature (°C): 49.96
Pre-Heat the Oven
Set Temperature to:
60 (°C) Start Pre-Heat
Consumables Information
Refresh
Consumable Name Status Days on Instrument Expiration Date Lot Number Part Number
Polymer POP4 48 Samples Remaining 5 06-Jan-2011 06... 1006009 4393715
Anode Buffer ABC 7 Days Remaining 0 18-Mar-2011 07... 1006014 4393927
Cathode Buffer CBC 7 Days Remaining 0 23-Mar-2011 07... 1007021 4408256
Capillary Array 36cm - 24 cap 94 Injections Remaining 51 03-Feb-2011 02... 08 4404687 - Serial # M309K0803
Maintenance Notifications
Name Priority Notification Date Description Action
92477A

Figura 2. El tablero.

2. Para crear un nuevo Protocolo de instrumentos, navegue hacia la biblioteca, seleccione "Instrument Protocol" (Protocolo de instrumentos), luego seleccione "Create" (Crear). Alternativamente, se puede utilizar un protocolo de instrumentos previamente creado.

La Figura 3 muestra las configuraciones utilizadas en Promega para el 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems® para el tipo de aplicación, conjunto de tintes, longitud del capilar, polímero, módulo de ejecución e información sobre el protocolo apropiada. La única configuración que se cambió de las configuraciones predeterminadas es el conjunto de tintes.

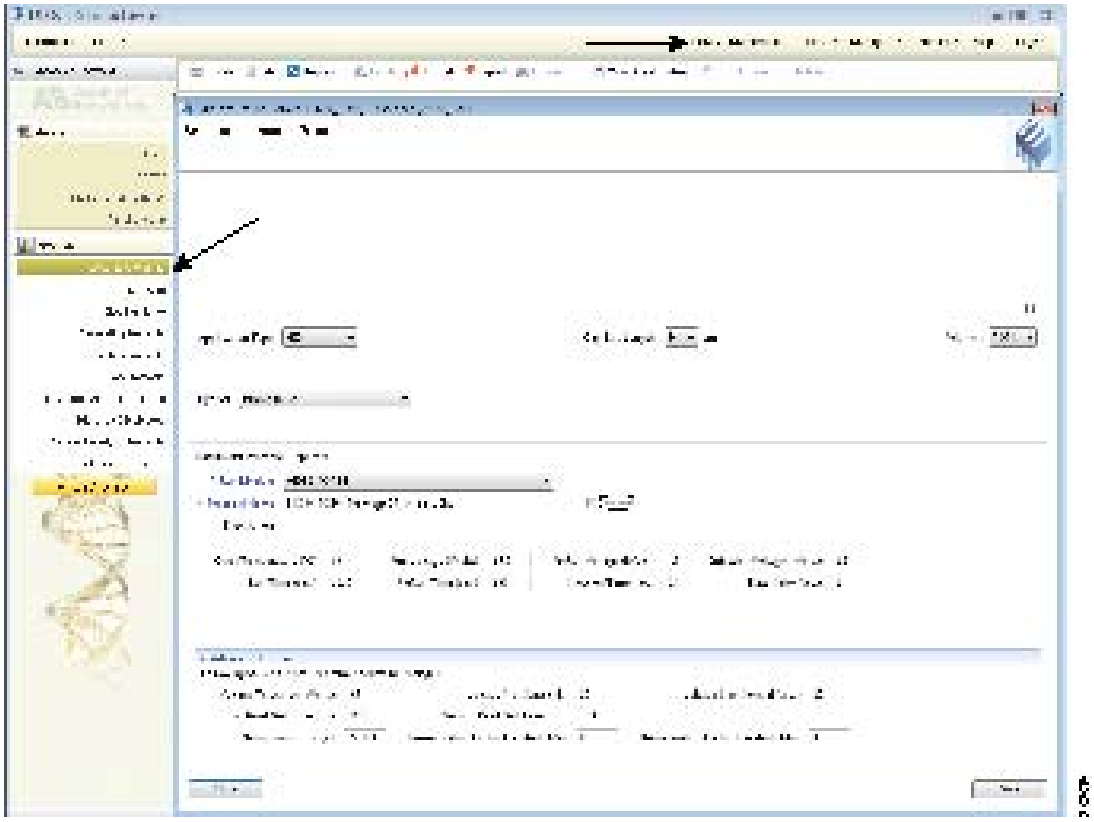

Figura 3. Ventana de creación de nuevos protocolos de instrumento.

Las configuraciones recomendadas son:

Tipo de aplicación	HID
Longitud del capilar	36 cm
Polímero	POP-4™
Conjunto de tintes	G5 (Promega G5 spectral)
Módulo de ejecución	HID36_POP4(xl)
Tiempo de inyección[1]	24 segundos
Voltaje de inyección	1,2 kV
Tiempo de ejecución	1,210–1,500 segundos

[1]El tiempo de inyección se puede modificar (2–24 segundos) para aumentar o disminuir las alturas de los picos.

5.A. Detección de fragmentos amplificados al utilizar el 3500 o el 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems® (continuación)

Cuando cree un protocolo de instrumentos, asegúrese de seleccionar el mismo conjunto de tintes que se utilizó para realizar la calibración espectral de 5 tintes de Promega. Recomendamos utilizar un tiempo de ejecución de 1210–1500 segundos y las condiciones de inyección predeterminadas.

El tiempo de ejecución y otras configuraciones de instrumentos se deben optimizar y validar en su laboratorio.

Cuando se optimizan las condiciones de inyección en su laboratorio, puede elegir crear protocolos de instrumentos específicos para cada condición evaluada. Si se utiliza un único protocolo de instrumentos, siga las instrucciones en la Guía de usuarios de *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* para editar una entrada de biblioteca.

Asigne un nombre descriptivo de protocolo.

Nota: Para obtener información más detallada, consulte la Guía de usuarios de *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers*.

3. Para crear un nuevo estándar de tamaño para el protocolo de control de calidad (QC), navegue hacia la biblioteca. Seleccione “Size Standards” (Estándares de tamaño), luego seleccione “Create” (Crear). Alternativamente, se puede utilizar un estándar de tamaño previamente creado.

   Asigne al estándar de tamaño el nombre “ILS500” u otro nombre apropiado. Elija “Orange” (Naranja) como el color de tinte. Los fragmentos en el estándar de tamaño son bases de 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 y 500. Consulte la figura 4.

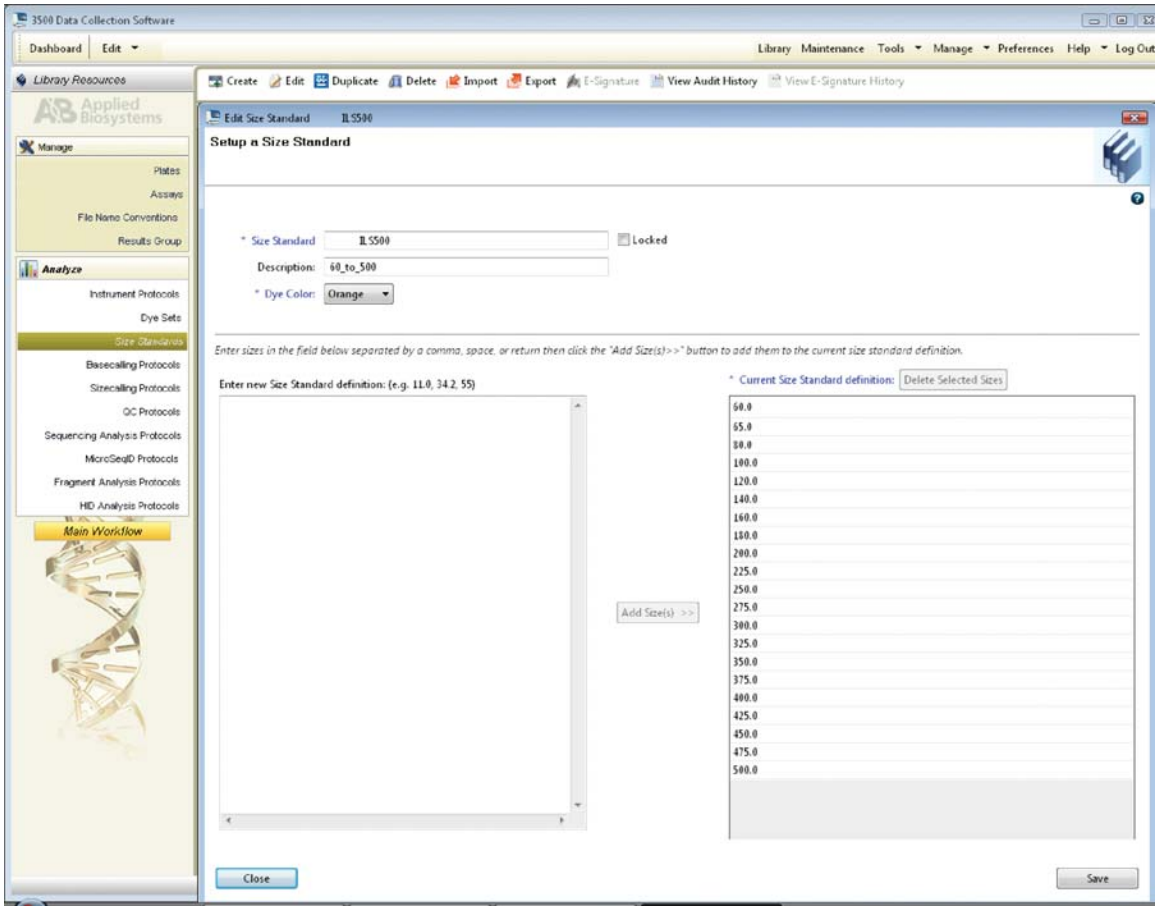

Figura 4. Ventana de creación de nuevos estándares de tamaño.

4. Para crear un nuevo protocolo de control de calidad, navegue hacia la biblioteca. Seleccione "QC Protocols" (Protocolos de control de calidad), luego seleccione "Create" (Crear). Alternativamente, se puede utilizar un protocolo de control de calidad previamente creado.

   Asigne un nombre descriptivo de protocolo. Seleccione el estándar de tamaño creado en el paso 3. Las configuraciones para el protocolo de control de calidad se deben basar en las condiciones internamente validadas para el PowerPlex® Fusion System en el 3500 o el 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems®. La figura 5 muestra una opción para estas configuraciones.

   Nota: Las alturas de pico para el CC5 Internal Lane Standard 500 son generalmente inferiores a las de los otros tintes. Por lo tanto, el umbral del tinte naranja puede ser inferior al de los otros tintes.

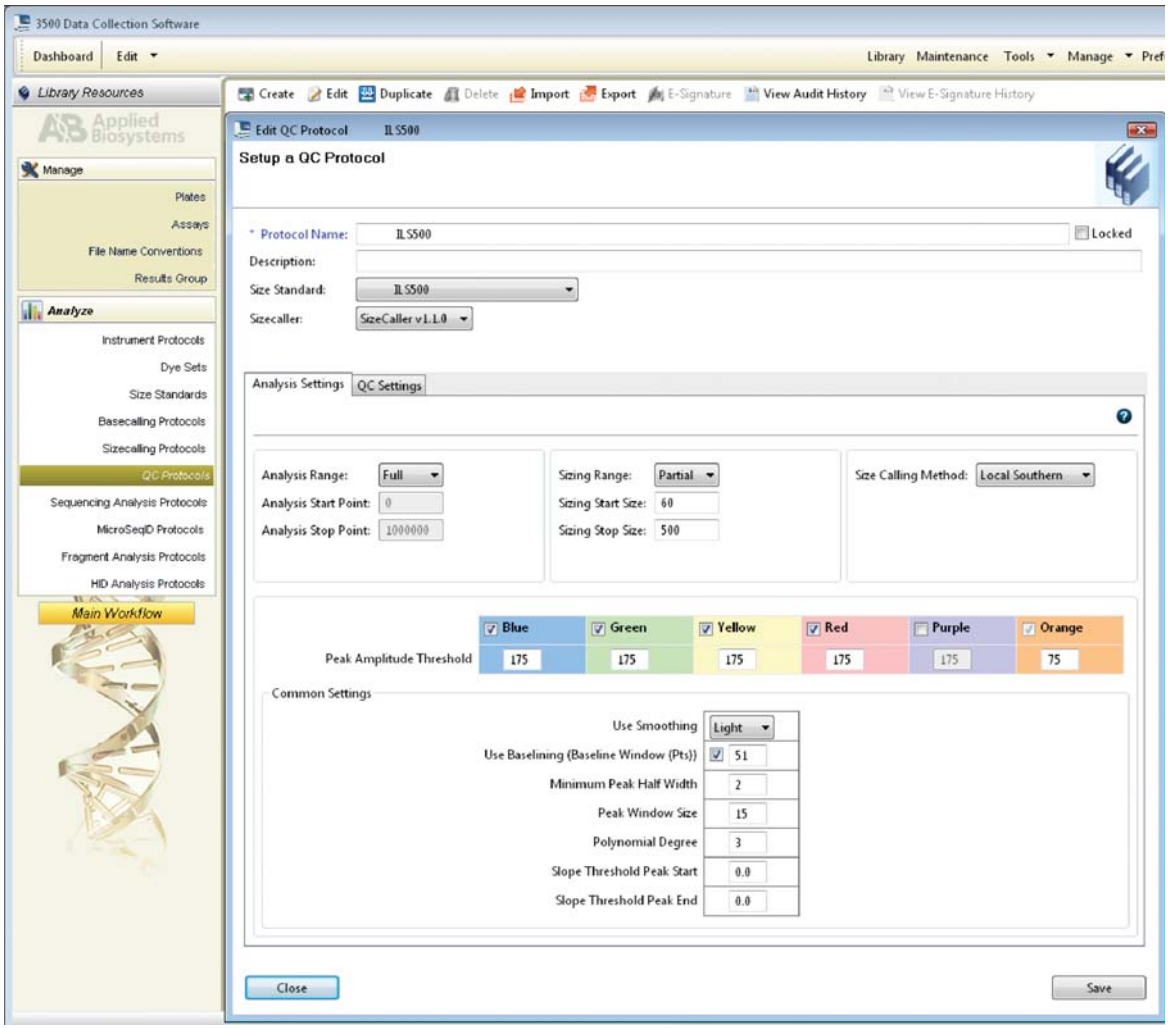

Figura 5. Ventana de creación de nuevos protocolos de QC.

5. Para crear un nuevo ensayo, navegue hacia la biblioteca. Seleccione "Assays" (Ensayo), luego seleccione "Create" (Crear). Alternativamente, se puede utilizar un ensayo previamente creado.

   En la ventana "Create New Assay" (Crear un nuevo ensayo) (figura 6), seleccione el Protocolo de instrumento creado en el paso 2 y el Protocolo de control de calidad creado en el Paso 4. Asigne un nombre descriptivo de ensayo. Seleccione el tipo de aplicación "HID". Se requiere un ensayo para todas las muestras nombradas en una placa.

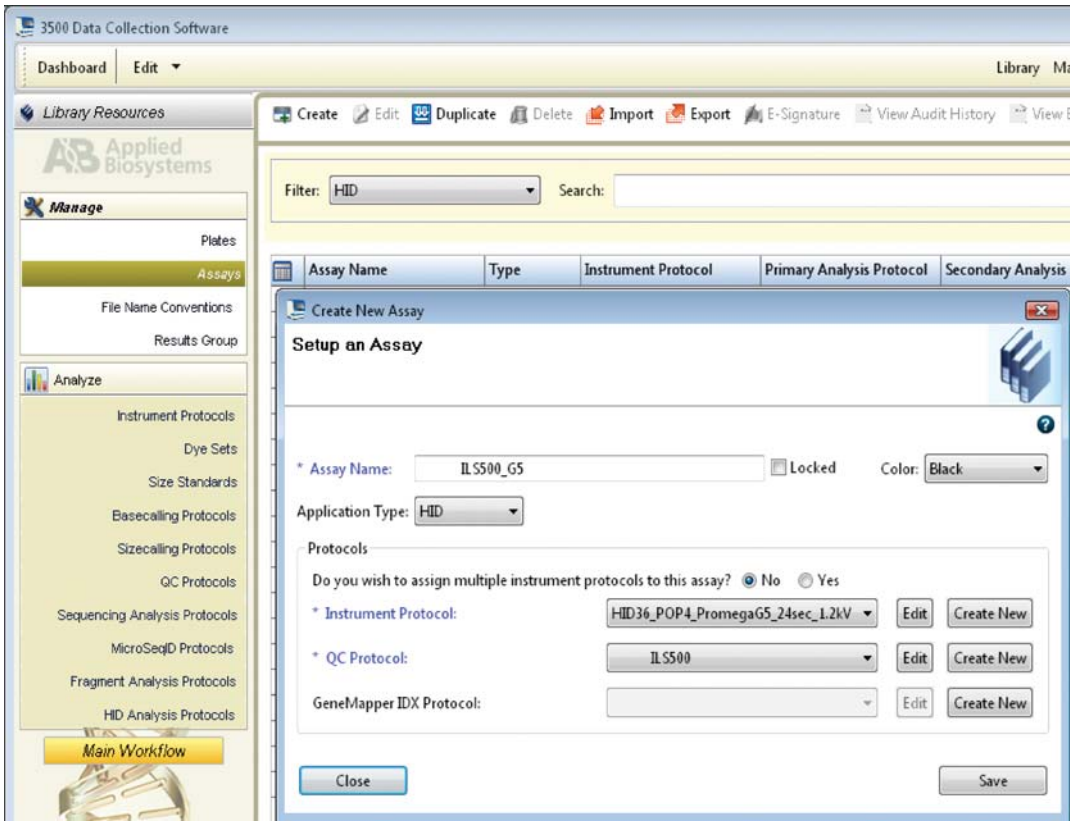

Figura 6. Ventana de creación de nuevos ensayos.

5.A. Detección de fragmentos amplificados al utilizar el 3500 o el 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems® (continuación)

6. Para crear una nueva convención sobre nombre de archivo (Figura 7), navegue hacia la biblioteca. Seleccione "File Name Conventions" (Convenciones sobre nombre de archivo), luego seleccione "Create" (Crear). Alternativamente, se puede utilizar una convención sobre nombre de archivo previamente creada.

   Seleccione los atributos de nombre de archivo de acuerdo con las prácticas del laboratorio, y guarde con un nombre descriptivo.

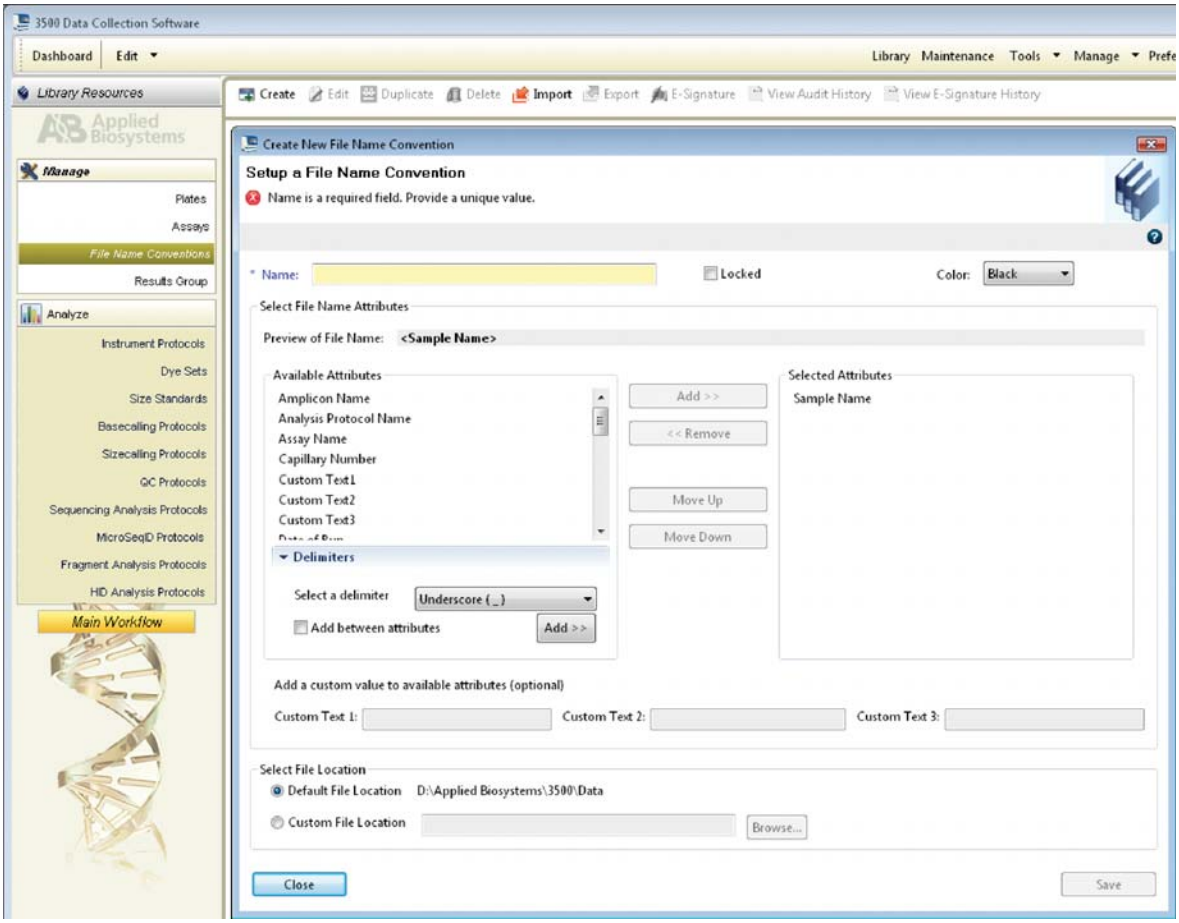

Figura 7. Ventana de creación de nuevas convenciones sobre nombre de archivo.

7. Para crear un nuevo Grupo de resultados (figura 8), navegue hacia la Biblioteca. Seleccione "Results Group" (Grupo de resultados), luego seleccione "Create" (Crear). Alternativamente, se puede utilizar un grupo de resultados previamente creado.

   Seleccione los atributos de grupo de resultados de acuerdo con las prácticas del laboratorio. Guarde con un nombre descriptivo.

8. Para crear una nueva placa, navegue hacia la biblioteca, y desde el menú "Manage" (Administrar), seleccione "Plates" (Placas), luego "Create" (Crear).

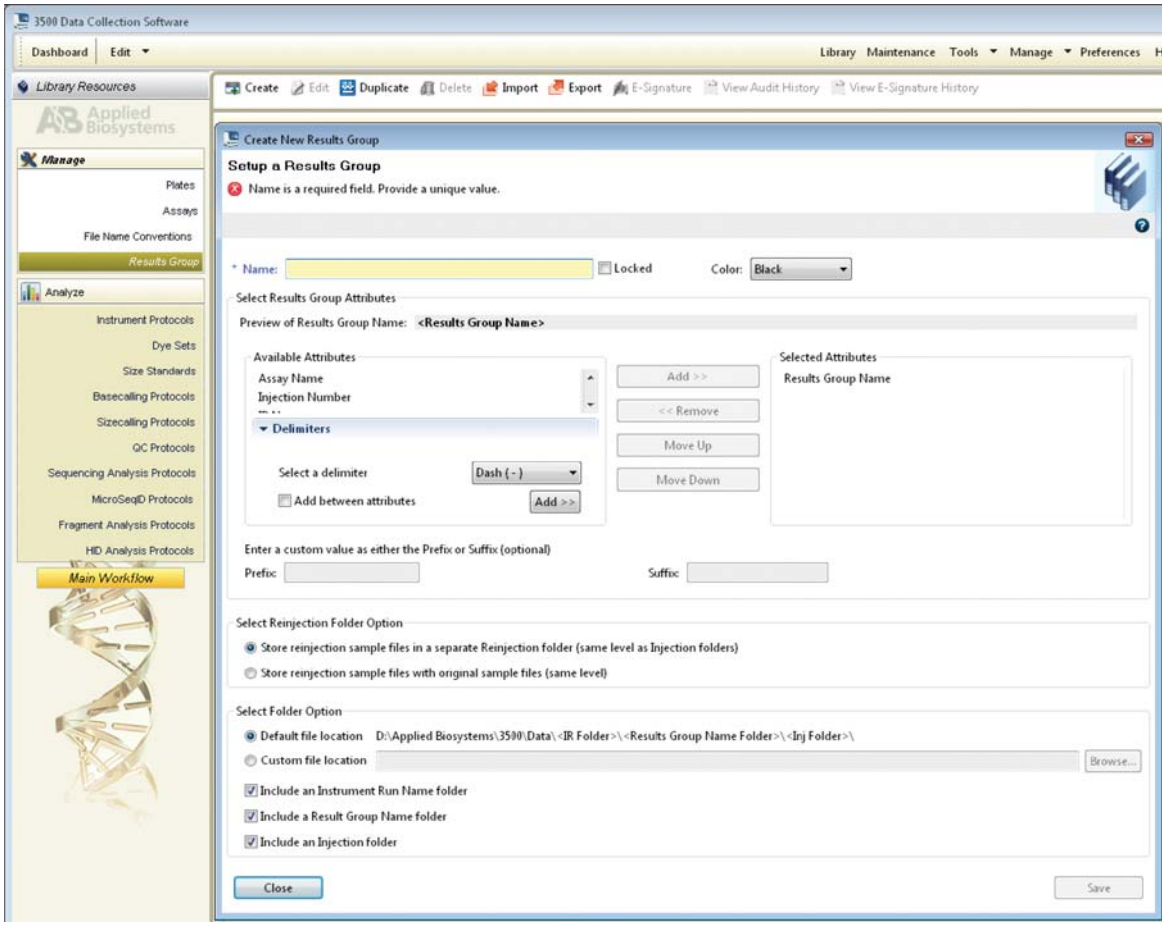

Figura 8. Ventana de creación de nuevos grupos de resultados.

9. Asigne un nombre descriptivo de placa. Seleccione el tipo de placa "HID" del menú desplegable (figura 9).

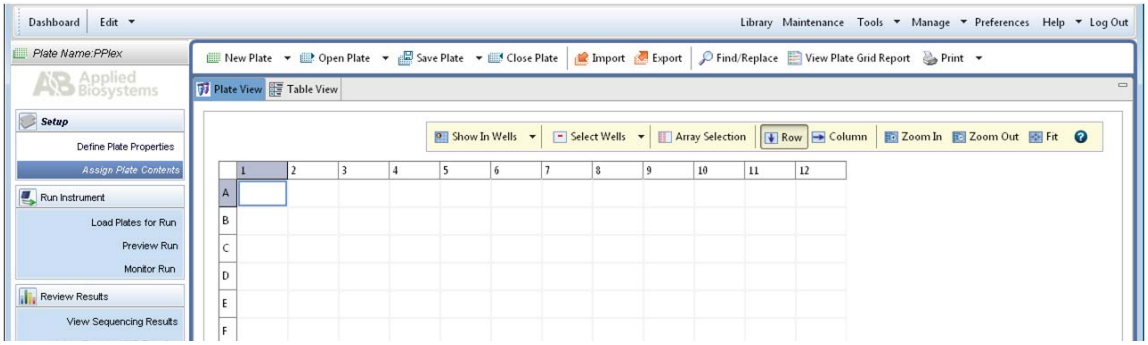

Figura 9. Cómo definir propiedades de placas.

10. Seleccione "Assign Plate Contents" (Asignar contenido de la placa) (figura 10).
11. Asigne nombres de muestra a los pocillos.
12. En la parte inferior izquierda de la pantalla, bajo el título "Assays" (Ensayos), utilice la opción "Add" (Agregar) de la biblioteca para seleccionar el ensayo

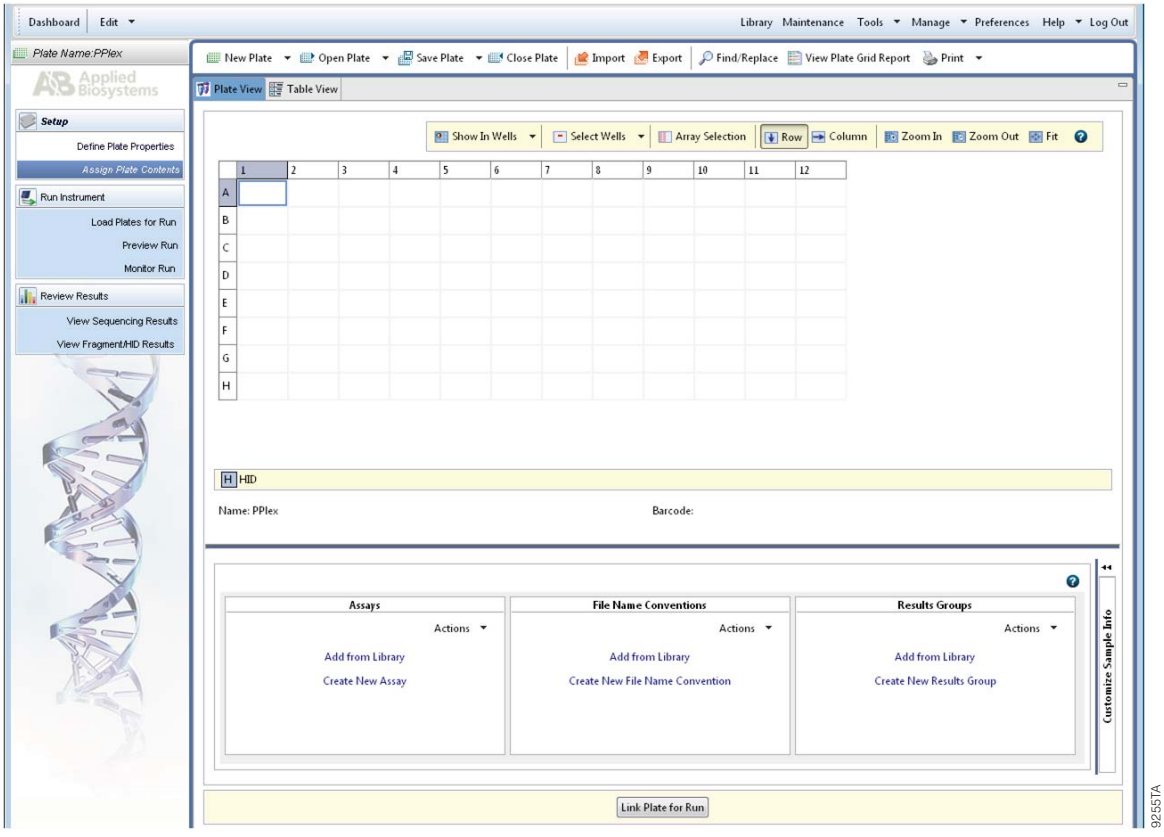

Figura 10. Cómo asignar contenido a las placas.

creado en el paso 5 o uno previamente creado. Haga clic en el botón "Add to Plate" (Agregar a la placa), y cierre la ventana.

13. Bajo el título "File Name Convention" (Convención sobre nombre de archivo), utilice la opción "Add from Library" (Agregar de la biblioteca) para seleccionar la convención sobre nombre de archivo creada en el paso 6 o una previamente creada. Haga clic en el botón "Add to Plate" (Agregar a la placa), y cierre la ventana.

14. Bajo el título "Results Groups" (Grupos de resultados), utilice la opción "Add from Library" (Agregar de la biblioteca) para seleccionar los grupos de resultados creados en el paso 7 u otros previamente creados. Haga clic en el botón "Add to Plate" (Agregar a la placa), y cierre la ventana.

15. Resalte los pocillos de muestra, luego seleccione las casillas en los ensayos, convenciones sobre nombre de archivo y grupos de resultados que corresponden a aquellas muestras.

16. Seleccione "Link Plate for Run" (Vincular placa para ejecutar).

17. Aparecerá la ventana "Load Plate" (Cargar placa). Seleccione "Yes" (Sí).

18. En la ventana "Run Information" (Ejecutar información) (figura 11), asigne un nombre de ejecución. Seleccione "Start Run" (Comenzar ejecución) (no se muestra).

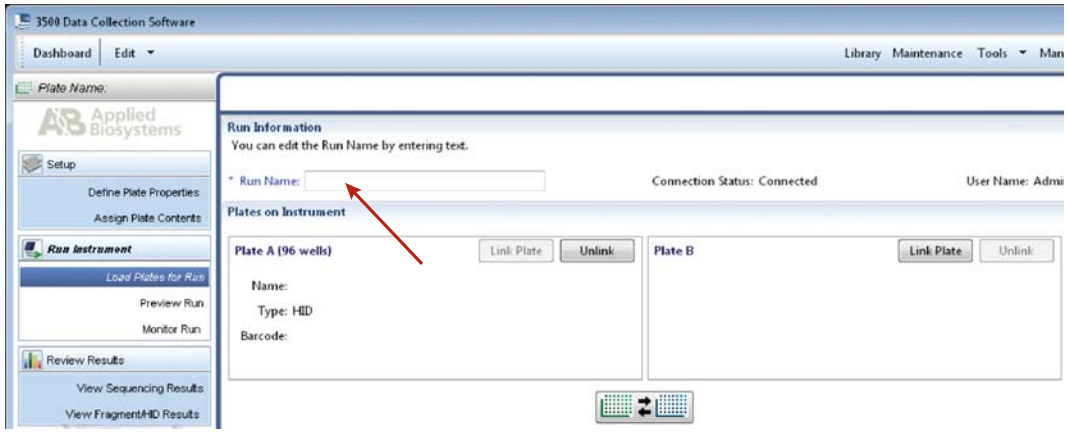

Figura 11. Cómo asignar un nombre de ejecución.

5.B. Detección de fragmentos amplificados utilizando ABI PRISM® 3100 o *Avant* Genetic Analyzer 3100 con el software de recolección de datos, Versión 2.0, o el 3130 o 3130*xl* Genetic Analyzer de Applied Biosystems® con el software de recolección de datos, Versión 3.0

Materiales que deberá suministrar el usuario

- calentador en seco de 95 °C, baño de agua o termociclador
- hielo picado o baño de hielo
- centrifugador compatible con placas de 96 pocillos
- puntas para pipetas resistentes al aerosol
- serie capilar de 3100 o 3130, 36 cm
- polímero de rendimiento optimizado 4 (POP-4™) para el 3100 o 3130
- buffer 10X con EDTA para el analizador genético
- placa óptica de 96 pocillos y septa MicroAmp®, o equivalente
- formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems Nro. de Cat. 4311320)

La calidad de la formamida es fundamental. Use formamida Hi-Di™. Congele la formamida en alícuotas a –20 °C. Los múltiples ciclos de congelación/descongelación o el almacenamiento a largo plazo a 4 °C pueden provocar la descomposición de la formamida. La formamida de mala calidad puede contener iones que compitan con el ADN durante la inyección, lo que provoca alturas de pico inferiores y sensibilidad reducida. Un mayor tiempo de inyección no puede aumentar la señal.

La formamida es un agente irritante y teratógeno, evite la inhalación y el contacto con la piel. Lea la etiqueta de advertencia y tome las precauciones apropiadas cuando maneje esta sustancia. Use siempre guantes y anteojos de seguridad cuando trabaje con formamida.

Preparación de la muestra

1. Descongele el CC5 Internal Lane Standard 500.

   Nota: Centrifugue brevemente el tubo para que el contenido se desplace hacia el fondo, luego agite durante 15 segundos antes de cada uso. No centrifugue después de agitar, ya que esto puede provocar que el estándar de tamaño se concentre en el fondo del tubo.

2. Prepare un cóctel de carga combinando y mezclando el estándar de carril interno CC5 Internal Lane Standard 500 y la formamida Hi-Di™ de la siguiente manera:

   [(1,0 µl CC5 ILS 500) × (Nro. de muestras)] + [(10,0 µl de formamida Hi-Di™) × (Nro. de muestras)]

   Nota: El volumen del estándar de carril interno utilizado en el cóctel de carga puede ser aumentado o disminuido para ajustar la intensidad de los picos de estándar de tamaño, según las preferencias del laboratorio. Mantenga el volumen de la formamida a 10,0 µl, y ajuste el volumen agregado a los pocillos en el paso 4 de manera acorde.

3. Agite durante 10–15 segundos para mezclar.

4. Pipetee 11 µl de formamida/mezcla de estándar de carril interno en cada pocillo.

5. Agregue 1 µl de la muestra amplificada (o 1 µl de PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix). Cubra los pocillos con la septa apropiada.

   Nota: Los límites de detección del instrumento varían, por lo tanto, el tiempo de inyección, el voltaje de inyección o la cantidad de muestra mezclada con el cóctel de carga pueden necesitar ser ajustados. Utilice el administrador de módulos en el software de recolección de datos para modificar el tiempo o el voltaje de inyección en el módulo de ejecución (consulte la sección Preparación de instrumentos que figura abajo). Si se reduce el tiempo o el voltaje de la inyección, se puede requerir un umbral de amplitud de pico reducido para el canal naranja, para un tamaño correcto.

6. Centrifugue brevemente la placa para eliminar las burbujas de aire de los pocillos.

7. Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos, luego enfríe de inmediato sobre hielo picadoo en un baño de hielodurante 3 minutos. Desnaturalice las muestras justo antes de cargar el instrumento.

Preparación del instrumento

Consulte el manual de usuario del instrumento para obtener las instrucciones de limpieza e instalación de la serie capilar, realizar una calibración espacial y agregar un polímero.

Analice las muestras como se describe en el manual de usuario para el ABI PRISM® 3100 o el 3100-*Avant* Genetic Analyzer con el software de recolección de datos, Versión 2.0, y el 3130 o el 3130*xl* Genetic Analyzer de Applied Biosystems® con el software de recolección de datos, Versión 3.0, con las siguientes excepciones.

1. En el administrador de módulos, seleccione “New” (Nuevo). Seleccione “Regular” en la lista desplegable “Type” (Tipo), y seleccione “HIDFragmentAnalysis36_POP4” en la lista desplegable “Template” (Plantilla). Confirme que el tiempo de inyección sea de 5 segundos, el voltaje de inyección sea de 3 kV y el tiempo de ejecución sea de 1500 segundos. Proporcione un nombre descriptivo a su módulo de ejecución, y seleccione “OK” (Aceptar).

   Nota: Las sensibilidades del instrumento pueden variar. El tiempo y el voltaje de inyección se pueden ajustar en el administrador de módulos. Un rango sugerido para el tiempo de inyección es de 3–22 segundos y para el voltaje de inyección es de 1–3 kV.

2. En el administrador de protocolos, seleccione “New” (Nuevo). Tipee un nombre para su protocolo. Seleccione “Regular” en la lista desplegable “Type” (Tipo), y seleccione el módulo de ejecución que creó en el paso anterior en la lista desplegable “Run Module” (Ejecutar módulos). Por último, seleccione “G5” de la lista desplegable de conjunto de tintes. Seleccione “OK” (Aceptar).

5.B. Detección de fragmentos amplificados utilizando ABI PRISM® 3100 o *Avant* Genetic Analyzer 3100 con el software de recolección de datos, Versión 2.0, o el 3130 o 3130*xl* Genetic Analyzer de Applied Biosystems® con el software de recolección de datos, Versión 3.0 (continuación)

3. En el administrador de placas, cree un nuevo registro de placas como se describe en el manual de usuario del instrumento. En el cuadro de diálogo que aparece, seleccione "GeneMapper—Generic" (GeneMapper - genérico) en la lista desplegable "Application" (Aplicación), y seleccione el tipo de placa apropiado (96 pocillos). Agregue entradas en las ventanas del propietario y operador, y seleccione "OK" (Aceptar).

   Nota: Si desea realizar el autoanálisis de los datos de muestra, consulte el manual de usuario del instrumento para obtener instrucciones.

4. En el registro de placas de GeneMapper, ingrese los nombres de las muestras en las celdas apropiadas. Desplácese hacia la derecha. En la columna de grupo de resultados 1, seleccione el grupo de resultados deseado. En la columna de protocolo de instrumentos 1, seleccione el protocolo que creó en el paso 2. Asegúrese de que la información esté presente en cada hilera que contiene un nombre de muestra. Seleccione "OK" (Aceptar).

   Nota: Para crear un nuevo grupo de resultados, seleccione "New" (Nuevo) en el menú desplegable en la columna de grupo de resultados. Seleccione la pestaña "General", e ingrese un nombre. Seleccione la pestaña "Analysis" (Análisis), y seleccione "GeneMapper—Generic" (GeneMapper - genérico) en la lista desplegable "Analysis Type" (Tipo de análisis).

5. Coloque las muestras en el instrumento, y cierre las puertas del instrumento.

6. En el visor espectral, seleccione el conjunto de tintes G5 y confirme que el conjunto de tintes activo es el archivo generado para la química de 5 tintes del PowerPlex®.

   Es fundamental seleccionar el espectral G5 correcto para la química de 5 tintes del PowerPlex®.

   Si la química de 5 tintes del PowerPlex® no es el conjunto de tintes activos, localice el espectral de 5 tintes del PowerPlex® en la lista de calibraciones para el conjunto de tintes G5 y seleccione "set" (configurar).

7. En el programador de ejecución, localice el registro de placas que creó en los pasos 3 y 4, y haga clic una vez en el nombre para resaltarlo.

8. Una vez que el registro de placas esté resaltado, haga clic en el gráfico de placas que corresponde a la placa en el extractor automático que contiene sus muestras amplificadas.

9. Cuando el registro de placas esté vinculado a la placa, el gráfico de placas cambiará de amarillo a verde, y se habilitará la fecha verde de "Run Instrument" (Ejecutar instrumento).

10. Haga clic en la flecha verde de "Run Instrument" (Ejecutar instrumento) en la barra de herramientas para comenzar la ejecución de la muestra.

11. Controle la electroforesis observando la ventana del visor de la ejecución, la vista, el ensayo o los capilares en el software de recolección de datos. Cada inyección durará aproximadamente 40 minutos.

6. Análisis de datos

6.A. Cómo importar archivos de texto de paneles, intervalos y repeticiones de PowerPlex® Fusion con software GeneMapper® *ID-X*, Versión 1.2

Para facilitar el análisis de los datos generados con el PowerPlex® Fusion System, hemos creados archivos de texto de paneles e intervalos para permitir la asignación automática de los genotipos con el software GeneMapper® *ID-X*. Recomendamos que los usuarios reciban capacitación de Applied Biosystems sobre el software GeneMapper® *ID-X* para familiarizarse con el funcionamiento correcto del software.

Nota: Los archivos de texto de paneles, intervalos y repeticiones mencionados aquí son compatibles con las versiones anteriores del software GeneMapper® *ID-X*.

Inicio

1. Para obtener los archivos de texto de paneles, intervalos y repeticiones para el PowerPlex® Fusion System visite: **www.promega.com/resources/tools/genemapper-id-software-panels-and-bin-sets/**

2. Seleccione el PowerPlex® System que está usando, seleccione "GeneMapper ID-X" así como el ADN de control que utiliza. Ingrese su información de contacto, y seleccione "Submit" (Enviar).

3. Guarde los archivos PowerPlex_Fusion_Panels_IDX_vX.x.txt, PowerPlex_Fusion_Bins_IDX_vX.x.txt and PowerPlex_Fusion_Stutter_IDX_vX.x.txt, donde "X.x" se refiere a la versión más reciente de los archivos de texto de paneles, intervalos y repeticiones, en un lugar conocido en su computadora.

Cómo importar archivos de texto de paneles, intervalos y repeticiones

1. Abra el software GeneMapper® *ID-X*.

2. Seleccione "Tools" (Herramientas), luego "Panel Manager" (Administrador de paneles).

3. Resalte el icono "Panel Manager" (Administrador de paneles) en el panel de navegación superior izquierdo.

4. Seleccione "File" (Archivo), luego "Import Panels" (Importar paneles).

6.A. Cómo importar archivos de texto de paneles, intervalos y repeticiones de PowerPlex® Fusion con software GeneMapper® *ID*-X, Versión 1.2 (continuación)

5. Navegue hacia el archivo de texto de paneles importado en la sección "Getting Started" (Inicio). Seleccione el archivo, luego "Import" (Importar).
6. En el panel de navegación, resalte la carpeta de paneles del PowerPlex Fusion que importó en el paso 5.
7. Seleccione "File" (Archivo), luego "Import Bin Set" (Importar conjunto de intervalos).
8. Navegue hacia el archivo de texto de intervalos importado en la sección "Getting Started" (Inicio). Seleccione el archivo, luego "Import" (Importar).
9. En el panel de navegación, resalte la carpeta de paneles del PowerPlex Fusion que importó en el paso 5.
10. Seleccione "File" (Archivo), luego "Import Marker Stutter" (Importar marcador de repeticiones). Aparecerá una casilla de advertencia preguntando si desea sobrescribir los valores actuales. Seleccione "Yes" (Sí).
11. Navegue hacia el archivo de texto de repeticiones importado en la sección "Getting Started" (Inicio). Seleccione el archivo, luego "Import" (Importar).
12. Al final de la ventana del administrador de paneles, seleccione "OK" (Aceptar). Esto guardará los archivos de texto de paneles, intervalos y repeticiones, luego cierre la ventana.

6.B. Cómo importar el CC5 ILS 500 IDX Size Standard en el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 1.2

Hay dos opciones cuando se crea un estándar de tamaño. Utilice este protocolo o el protocolo alternativo en la sección 6.C.

El archivo CC5_ILS_500_IDX.xml está disponible para descargar en: **www.promega.com/resources/tools/genemapper-id-software-panels-and-bin-sets/**

Guarde el archivo CC5_ILS_500_IDX.xml en un lugar conocido en su computadora.

1. Seleccione "Tools" (Herramientas), luego "GeneMapper ID-X Manager" (Administrador de GeneMapper ID-X).
2. Seleccione la pestaña "Size Standar" (Estándar de tamaño).
3. Seleccione "Import" (Importar).
4. Navegue hacia la ubicación del archivo CC5_ILS_500_IDX.xml en su computadora.

5. Seleccione el archivo, luego seleccione “Import” (Importar).

6. Seleccione “Done” (Realizado) para guardar los cambios y cierre el administrador de GeneMapper ID-X.

6.C. Cómo crear un estándar de tamaño con el software GeneMapperr® *ID*-X, Versión 1.2

1. Seleccione “Tools” (Herramientas), luego “GeneMapper ID-X Manager” (Administrador de GeneMapper ID-X).

2. Seleccione la pestaña “Size Standar” (Estándar de tamaño).

3. Seleccione “New” (Nuevo).

4. En la ventana del “Size Standard Editor” (Editor de estándar de tamaño) (figura 12), seleccione “GeneMapper ID-X Security Group” como el grupo de seguridad. Esto permite el acceso a todos los usuarios del software. Se pueden utilizar otros grupos de seguridad.

5. Ingrese un nombre detallado, como “CC5_ILS_500_IDX”.

6. Elija “Orange” (Naranja) para el “Size Standard Dye” (Tinte de estándar de tamaño).

7. Ingrese los tamaños de los fragmentos de estándar de carril interno (bases de 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 y 500). Consulte la sección 9.C, figura 24.

8. Seleccione “OK” (Aceptar).

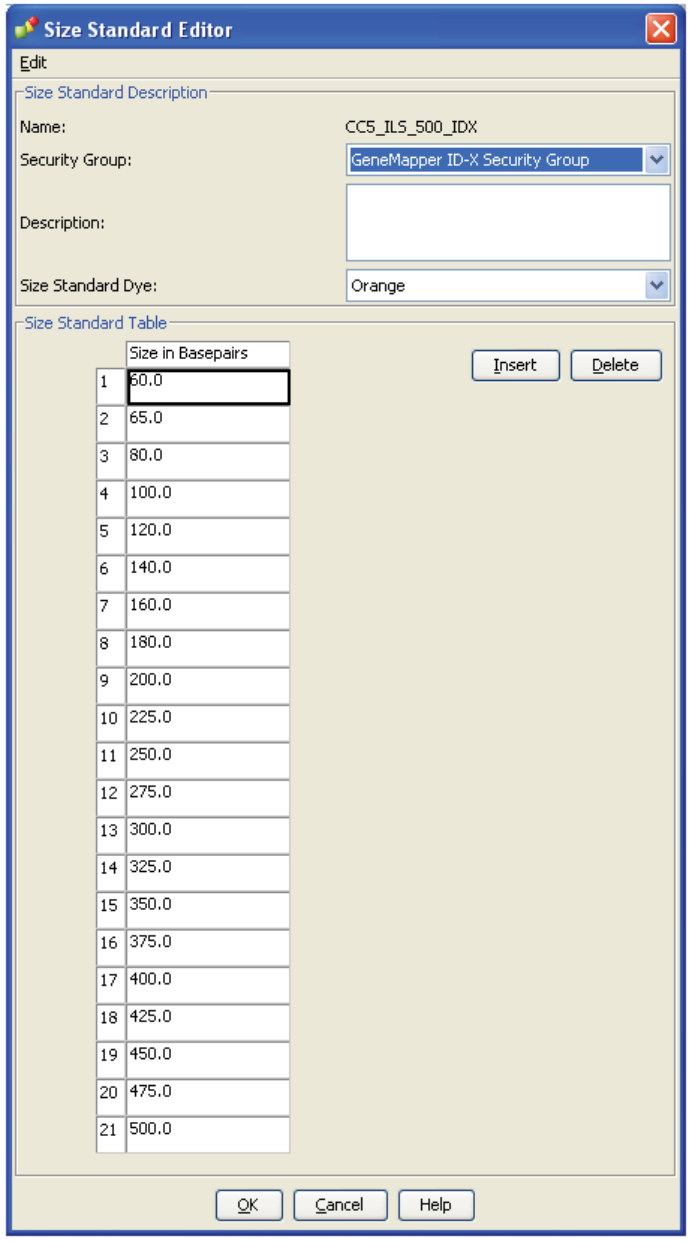

Figura 12. El GeneMapper® *ID*-X Size Standard Editor.

6.D. Cómo crear un método de análisis de casos con el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 1.2

Estas instrucciones tienen el propósito de servir como guía para comenzar a analizar los datos en el software GeneMapper® *ID*-X. No están destinadas a ser una guía exhaustiva para utilizar el software GeneMapper® *ID*-X. Recomendamos que los usuarios se comuniquen con Applied Biosystems para obtener capacitación sobre el software.

1. Seleccione "Tools" (Herramientas), luego "GeneMapper ID-X Manager" (Administrador de GeneMapper ID-X).
2. Seleccione la pestaña "Analysis Methods" (Métodos de análisis).
3. Seleccione "New" (Nuevo) y se abrirá un nuevo cuadro de diálogo de método de análisis.
4. En la ventana "Analysis Method Editor" (Editor de método de análisis), seleccione "GeneMapper ID-X Security Group" como el grupo de seguridad. Esto permite el acceso a todos los usuarios del software. Se pueden utilizar otros grupos de seguridad.
5. Ingrese un nombre descriptivo para el método de análisis, como por ejemplo, "PowerPlex Fusion".
6. Seleccione la pestaña "Allele" (Alelo) (figura 13).
7. Seleccione el archivo de texto de intervalos que se importó en la sección 6.A.
8. Asegúrese de que la casilla "Use marker-specific stutter ratio and distance if available" (Utilizar proporción de repeticiones de marcador específico y distancia si está disponible) esté marcada.
9. Recomendamos los valores mostrados en la figura 13 para un correcto filtrado de los picos de las repeticiones cuando se utiliza el PowerPlex® Fusion System. Es posible que deba optimizar estas configuraciones. Debe realizarse una validación interna.

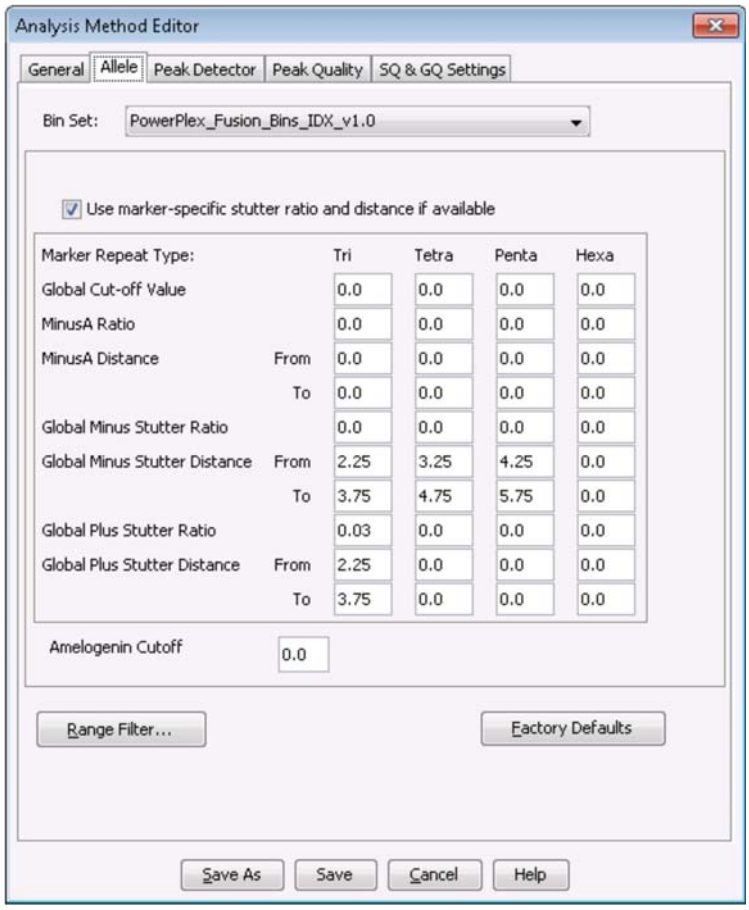

Figura 13. La pestaña "Allele" (Alelo) del GeneMapper® *ID*-X.

10. Seleccione la pestaña "Peak Detector" (Detector de picos). La figura 14 muestra un ejemplo de las configuraciones utilizadas en Promega. Es posible que deba optimizar estas configuraciones. Debe realizarse una validación interna.

    Notas:

    1. Seleccione el rango completo o un rango parcial para el rango de análisis. Cuando se utiliza un rango parcial, elija un rango de análisis apropiado según sus datos. Elija un punto de inicio después del pico de imprimación y antes del primer pico del estándar de carril interno definido para ayudar a asegurar el tamaño correcto del estándar de carril interno.
    2. Los umbrales de amplitud del pico son las alturas del pico mínimas a las que el software considerará pico. Los valores para los umbrales de amplitud de pico son generalmente de 50–150 RFU para los datos generados en el ABI PRISM® 3100 y el 3100-*Avant* Genetic Analyzers, y el 3130 y 3130xl *Genetic Analyzers de Applied Biosystems*®. Para el 3500 y el 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems® Life

Technologies sugiere un umbral de análisis de 175 RFU según sus condiciones de inyección predeterminadas. Sin embargo, los laboratorios individuales deben determinar los umbrales de amplitud de pico según los estudios de validación interna. Las alturas de pico para el CC5 ILS 500 son generalmente inferiores a las de los otros tintes. Por lo tanto, el umbral del tinte naranja puede ser inferior al de los otros tintes.

3. La casilla de normalización puede estar marcada independientemente de si la normalización se aplicó o no durante la recolección de datos.

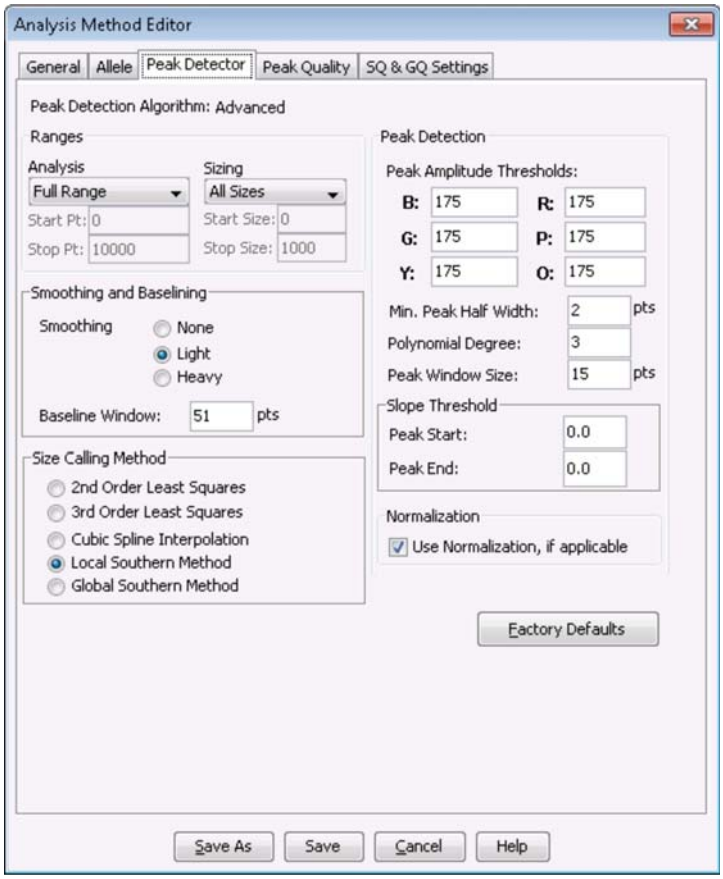

Figura 14. La pestaña "Peak Detector" (Detector de picos) del GeneMapper® *ID*-X.

11. Seleccione la pestaña "Peak Quality" (Calidad de picos). Puede cambiar las configuraciones para la calidad de picos.

    Nota: Para los pasos 11 y 12, consulte el manual de usuario de GeneMapper® *ID*-X para obtener información.

12. Seleccione la pestaña "SQ & GQ Settings" (Configuraciones de SQ y GQ). Puede cambiar estas configuraciones.

13. Seleccione "Save" (Guardar) para guardar el nuevo método de análisis.

14. Seleccione "Done" (Realizado) para salir del administrador de GeneMappeer ID-X.

6.D. Cómo crear un método de análisis de casos con el software GeneMapper® *ID-X*, Versión 1.2 (continuación)

Cómo procesar los datos para las muestras de casos

1. Seleccione "File" (Archivo), luego "New Project" (Nuevo proyecto).
2. Seleccione "Edit" (Editar), luego "Add Samples to Project" (Agregar muestras al proyecto).
3. Busque la ubicación de los archivos de ejecución. Resalte los archivos deseados, luego seleccione "Add to list" (Agregar a la lista) seguido por "Add" (Agregar).
4. En la columna "Sample Type" (Tipo de muestra), utilice el menú desplegable para seleccionar "Allelic Ladder" (Escalera alélica), "Sample" (Muestra), "Positive Control" (Control positivo) o "Negative Control" (Control negativo) según sea lo apropiado para la muestra. Cada carpeta en el proyecto debe contener al menos una inyección de escalera alélica designada como "Allelic Ladder" (Escalera alélica) en la columna "Sample Type" (Tipo de muestra) para la determinación del genotipo correcto.

   Nota: El ADN de control positivo definido en el archivo del panel GeneMapper® *ID*-X es el ADN de control 2800M. Redefina el genotipo en el archivo del panel si utiliza un ADN de control positivo diferente.
5. En la columna de "Analysis Method" (Método de análisis), seleccione el método de análisis creado anteriormente.
6. En la columna "Panel", seleccione el archivo de texto de panel que se importó en la sección 6.A.
7. En la columna "Size Standard" (Estándar de tamaño), seleccione el estándar de tamaño que se importó en la sección 6.B o se creó en la sección 6.C.
8. Seleccione "Analyze" (Analizar, el botón de flecha verde) para comenzar el análisis de datos.

   Nota: De manera predeterminada, el software muestra las ventanas de "Analysis Requirement Summary" (Resumen de requisitos de análisis), "Allelic Ladder Analysis Summary" (Resumen de análisis de escalera alélica) y "Analysis Summary" (Resumen de análisis) después de que el software lleva a cabo una revisión de calidad. Asegúrese de que se cumplan todos los requisitos a medida que aparezca cada ventana. Si no tiene la ventana de resumen de requisitos de análisis activada, es posible que deba hacer una resolución de problemas manual adicional.

9. Si se cumplen todos los requisitos de análisis, se abrirá la ventana "Save Project" (Guardar proyecto) (figura 15).

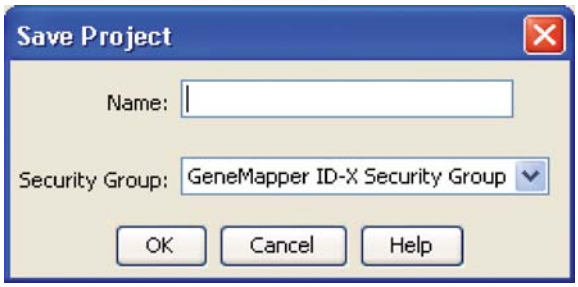

Figura 15. La ventana "Save Project" (Guardar proyecto).

10. Ingrese el nombre del proyecto.
11. Elija el grupo de seguridad correspondiente desde el menú desplegable, luego seleccione "OK" (Aceptar).

Nota: El tamaño de los alelos Penta E y DYS391 de bases ≥ 475 no utilizará el Método local del sur. Para Penta E, los alelos >24 se etiquetarán como "OL".

Cuando finalice el análisis, aparecerá la pantalla de resumen de análisis. Recomendamos que revise cualquier barra de encabezamiento del marcador amarilla o roja en la vista de gráficos y que la maneje de forma acorde a los procedimientos operativos estándar del laboratorio. Navegue hacia la pestaña "Genotype" (Genotipo) o la pestaña "Samples" (Muestras). Para ayudar a la revisión de cualquier muestra de baja calidad, utilice las configuraciones predeterminadas del gráfico de interpretación de datos y revise el contenido en la tabla "Quality Value Details" (Detalles de valor de calidad).

Los valores mostrados en las pestañas "Peak Quality" (Calidad de picos) y "SQ & GQ Settings" (Configuraciones de SQ & GQ) de "Analysis Method" (Método de análisis) son predeterminados y afectarán los valores de calidad mostrados en las configuraciones de gráficos. Recomendamos que modifique los valores en estas pestañas para ajustarse a los protocolos de análisis de datos de su laboratorio.

6.E. Cómo crear una base de datos o método de análisis de paternidad con el software GeneMapper® *ID*-X -X, Versión 1.2

Estas instrucciones tienen el propósito de servir como guía para comenzar a analizar los datos en el software GeneMapper® *ID*-X. No están destinadas a ser una guía exhaustiva para utilizar el software GeneMapper® *ID*-X. Recomendamos que los usuarios se comuniquen con Applied Biosystems para obtener capacitación sobre el software.

1. Seleccione "Tools" (Herramientas), luego "GeneMapper ID-X Manager" (Administrador de GeneMapper ID-X).
2. Seleccione la pestaña "Analysis Methods" (Métodos de análisis).

6.E. Cómo crear una base de datos o método de análisis de paternidad con el software GeneMapper® *ID-X*, Versión 1.2 (continuación)

3. Seleccione "New" (Nuevo), y se abrirá un nuevo cuadro de diálogo de método de análisis.
4. En la ventana "Analysis Method Editor" (Editor de método de análisis), seleccione "GeneMapper ID-X Security Group" como el grupo de seguridad. Esto permite el acceso a todos los usuarios del software. Se pueden utilizar otros grupos de seguridad.
5. Ingrese un nombre descriptivo para el método de análisis, como por ejemplo, "PowerPlex Fusion 20% Filter".
6. Seleccione la pestaña "Allele" (Alelo) (figura 16).
7. Seleccione el archivo de texto de intervalos que se importó en la sección 6.A.
8. Recomendamos los valores mostrados en la figura 16 para un correcto filtrado de los picos de las repeticiones cuando se utiliza el PowerPlex® Fusion System. Es posible que deba optimizar estas configuraciones. Debe realizarse una validación interna.

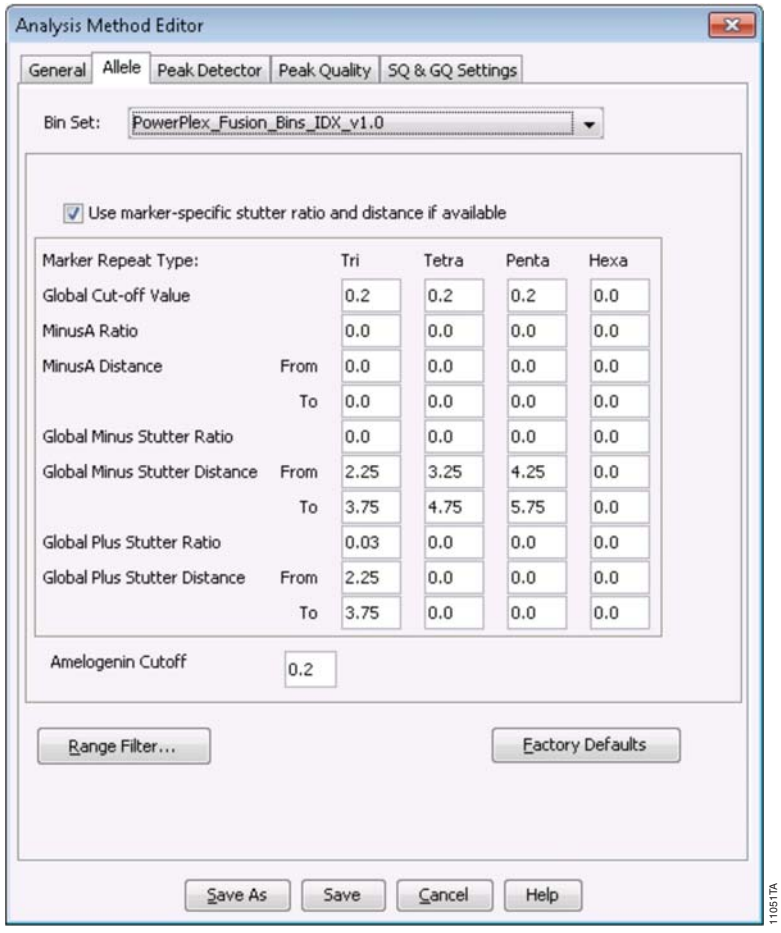

Figura 16. La pestaña "Allele" (Alelo) del GeneMapper® *ID-X*.

Nota: Asegúrese de que el filtro de 20% apropiado se aplique en este método de análisis ingresando "0,20" para el valor global límite para las repeticiones de Tri, Tetra y Penta.

9. Seleccione la pestaña "Peak Detector" (Detector de picos). La figura 14 muestra un ejemplo de las configuraciones utilizadas en Promega. Es posible que deba optimizar estas configuraciones. Debe realizarse una validación interna.

   Notas:

   1. Seleccione el rango completo o un rango parcial para el rango de análisis. Cuando se utiliza un rango parcial, elija un rango de análisis apropiado según sus datos. Elija un punto de inicio después del pico de imprimación y antes del primer pico del estándar de carril interno definido para ayudar a asegurar el tamaño correcto del estándar de carril interno.
   2. Los umbrales de amplitud del pico son las alturas del pico mínimas a las que el software considerará pico. Los valores para los umbrales de amplitud de pico son generalmente de 50–150 RFU en el ABI PRISM® 3100 y el 3100-*Avant* Genetic Analyzers, así como el 3130 y 3130*xl* Genetic Analyzers de Applied Biosystems®. Para el 3500 y el 3500xL Genetic Analyzer de Applied Biosystems® Life Technologies sugiere un umbral de análisis de 175 RFU según sus condiciones de inyección predeterminadas. Sin embargo, los laboratorios individuales deben determinar los umbrales de amplitud de pico según los estudios de validación interna. Las alturas de pico para el CC5 ILS 500 son generalmente inferiores a las de los otros tintes. Por lo tanto, el umbral del tinte naranja puede ser inferior al de los otros tintes.
   3. La casilla de normalización puede estar marcada independientemente de si la normalización se aplicó o no durante la recolección de datos.

10. Seleccione la pestaña "Peak Quality" (Calidad de picos). Puede cambiar las configuraciones para la calidad de picos.

    Nota: Para los pasos 10 y 11, consulte el manual de usuario de GeneMapper® *ID*-X para obtener información.

11. Seleccione la pestaña "SQ & GQ Settings" (Configuraciones de SQ y GQ). Puede cambiar estas configuraciones.

12. Seleccione "Save" (Guardar) para guardar el nuevo método de análisis.

13. Seleccione "Done" (Realizado) para salir del administrador de GeneMapper ID-X.

Cómo procesar datos para la base de datos o muestras de paternidad

1. Seleccione "File" (Archivo), luego "New Project" (Nuevo proyecto).

2. Seleccione "Edit" (Editar), luego "Add Samples to Project" (Agregar muestras al proyecto).

6.E. Cómo crear una base de datos o método de análisis de paternidad con el software GeneMapper® *ID-X*, Versión 1.2 (continuación)

3. Explore hasta la ubicación de los archivos de ejecución. Resalte los archivos deseados, luego seleccione "Add to list" (Agregar a la lista) seguido por "Add" (Agregar).

4. En la columna "Sample Type" (Tipo de muestra), utilice el menú desplegable para seleccionar "Allelic Ladder" (Escalera alélica), "Sample" (Muestra), "Positive Control" (Control positivo) o "Negative Control" (Control negativo) según sea lo apropiado para la muestra. Cada carpeta en el proyecto debe contener al menos una inyección de escalera alélica designada como "Allelic Ladder" (Escalera alélica) en la columna "Sample Type" (Tipo de muestra) para la determinación del genotipo correcto.

   Nota: El ADN de control positivo definido en el archivo del panel GeneMapper® *ID*-X es el ADN de control 2800M. Redefina el genotipo en el archivo del panel si utiliza un ADN de control positivo diferente.

   En la columna de "Analysis Method" (Método de análisis), seleccione el método de análisis creado anteriormente.

5. En la columna "Panel", seleccione el archivo de texto de panel que se importó en la sección 6.A.

6. En la columna "Size Standard" (Estándar de tamaño), seleccione el estándar de tamaño que se importó en la sección 6.B o se creó en la sección 6.C.

7. Seleccione "Analyze" (Analizar, el botón de flecha verde) para comenzar el análisis de datos.

   Nota: De manera predeterminada, el software muestra las ventanas de "Analysis Requirement Summary" (Resumen de requisitos de análisis), "Allelic Ladder Analysis Summary" (Resumen de análisis de escalera alélica) y "Analysis Summary" (Resumen de análisis) después de que el software lleva a cabo una revisión de calidad. Asegúrese de que se cumplan todos los requisitos a medida que aparezca cada ventana. Si no tiene la ventana de resumen de requisitos de análisis activada, es posible que deba hacer una resolución de problemas manual adicional.

8. Si se cumplen todos los requisitos de análisis, se abrirá la ventana "Save Project" (Guardar proyecto) (figura 15).

9. Ingrese el nombre del proyecto.

10. Elija el grupo de seguridad correspondiente desde el menú desplegable, luego seleccione "OK" (Aceptar).

Nota: El tamaño de los alelos Penta E y DYS391 de bases ≥ 475 no utilizará el Método local del sur. Para Penta E, los alelos >24 se etiquetarán como "OL".

Cuando finalice el análisis, aparecerá la pantalla de resumen de análisis. Recomendamos que revise cualquier barra de encabezamiento del marcador amarilla o roja en la vista de gráficos y que la maneje de forma acorde a los

procedimientos operativos estándar del laboratorio. Navegue hacia la pestaña "Genotype" (Genotipo) o la pestaña "Samples" (Muestras). Para ayudar a la revisión de cualquier muestra de baja calidad, utilice las configuraciones predeterminadas del gráfico de interpretación de datos y revise el contenido en la tabla "Quality Value Details" (Detalles de valor de calidad).

Los valores mostrados en las pestañas "Peak Quality" (Calidad de picos) y "SQ & GQ Settings" (Configuraciones de SQ & GQ) de "Analysis Method" (Método de análisis) son predeterminados y afectarán los valores de calidad mostrados en las configuraciones de gráficos. Recomendamos que modifique los valores en estas pestañas para ajustarse a los protocolos de análisis de datos de su laboratorio.

6.F. Cómo importar archivos de texto de paneles y bin de PowerPlex® Fusion con software GeneMapper® *ID*, Versión 3.2

Para facilitar el análisis de los datos generados con el PowerPlex® Fusion System, hemos creados archivos de texto de paneles e intervalos para permitir la asignación automática de los genotipos con el software GeneMapper® *ID*-X, versión 3.2. Recomendamos que los usuarios del software GeneMapper® *ID*, versión 3.2, completen el tutorial de análisis de identificación humana del software *GeneMapper®* ID *de Applied Biosystems* para familiarizarse con el funcionamiento correcto del software. Para el software GeneMapper® *ID*, versión 3.1, recomendamos a los usuarios que actualicen a la versión 3.2.

Para realizar análisis con el software GeneMapper® *ID*, versión 3.2, necesitará tener los archivos de texto de paneles e intervalos correctos: Los archivos PowerPlex_Fusion_Panels_vX.x.txt y PowerPlex_Fusion_Bins_vX.x.txt, donde "X.x" se refiere a la versión más reciente de los archivos de texto de paneles e intervalos.

Inicio

1. Para obtener los archivos de texto de paneles e intervalos para el PowerPlex® Fusion System, visite: **www.promega.com/resources/tools/genemapper-id-software-panels-and-bin-sets/**
2. Seleccione el PowerPlex® System que está usando, seleccione "GeneMapper ID" así como el ADN de control que utiliza. Ingrese su información de contacto, y seleccione "Submit" (Enviar).
3. Guarde los archivos PowerPlex_Fusion_Panels_IDX_vX.x.txt y PowerPlex_Fusion_Bins_IDX_vX.x.txt (donde "X.x" se refiere a la versión más reciente de los archivos de texto de paneles e intervalos) en un lugar conocido en su computadora.

Cómo importar archivos de texto de paneles e intervalos

Estas instrucciones siguen ligeramente el tutorial del software GeneMapper® *ID* de Applied Biosystems, páginas 1–4.

6.F. Cómo importar archivos de texto de paneles y bin de PowerPlex® Fusion con software GeneMapper® *ID*, Versión 3.2 (continuación)

1. Abra el software GeneMapper® *ID*, versión 3.2.
2. Seleccione "Tools" (Herramientas), luego "Panel Manager" (Administrador de paneles).
3. Resalte el icono "Panel Manager" (Administrador de paneles) en el panel de navegación superior izquierdo.
4. Seleccione "File" (Archivo), luego "Import Panels" (Importar paneles).
5. Navegue hacia el archivo de texto de paneles importado en la sección "Getting Started" (Inicio) mencionada anteriormente. Seleccione el archivo, luego "Import" (Importar).
6. En el panel de navegación, resalte la carpeta de paneles del PowerPlex Fusion que importó en el paso 5.
7. Seleccione "File" (Archivo), luego "Import Bin Set" (Importar conjunto de intervalos).
8. Navegue hacia el archivo de texto de intervalos importado en la sección "Getting Started" (Inicio) mencionada anteriormente. Seleccione el archivo, luego "Import" (Importar).
9. Al final de la ventana del administrador de paneles, seleccione "OK" (Aceptar). La ventana del administrador de paneles se cerrará automáticamente.

6.G. Cómo importar el estándar de tamaño CC5 ILS 500 en el software GeneMapper® *ID*, Versión 3.2

Hay dos opciones cuando se crea un estándar de tamaño. Utilice este protocolo o el protocolo alternativo en la sección 6.H.

El archivo CC5_ILS_500.xml está disponible para descargar en: **www.promega.com/resources/tools/genemapper-id-software-panels-and-bin-sets/**

Guarde el archivo CC5_ILS_500.xml en un lugar conocido en su computadora.

1. Seleccione "Tools" (Herramientas), luego "GeneMapper Manager" (Administrador de GeneMapper).
2. Seleccione la pestaña "Size Standar" (Estándar de tamaño).
3. Seleccione "Import" (Importar).
4. Busque la ubicación del archivo CC5_ILS_500.xml.
5. Seleccione el archivo, luego seleccione "Import" (Importar).
6. Seleccione "Done" (Realizado) para guardar los cambios y cierre el administrador de GeneMapper.

6.H. Cómo crear un estándar de tamaño con el software GeneMapper® *ID-X*, Versión 3.2

1. Seleccione "Tools" (Herramientas), luego "GeneMapper Manager" (Administrador de GeneMapper).
2. Seleccione la pestaña "Size Standar" (Estándar de tamaño).
3. Seleccione "New" (Nuevo).
4. Seleccione "Basic o Advanced" (Básico o avanzado) (figura 17). El tipo de método de análisis seleccionado debe coincidir con el tipo de método de análisis creado anteriormente. Seleccione "OK" (Aceptar).

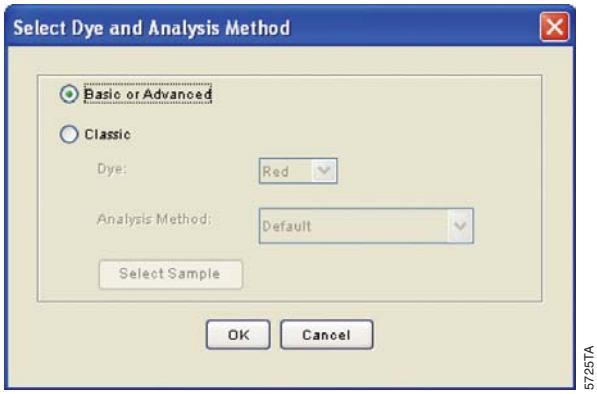

Figura 17. Ventana "Select Dye and Analysis Method" (Seleccionar tinte y método de análisis).

5. Ingrese un nombre detallado, como por ejemplo "CC5 ILS 60 a 500", en el "Size Standard Editor" (Editor de estándar de tamaño) (Figura 18).
6. Elija "Orange" (Naranja) para el "Size Standard Dye" (Tinte de estándar de tamaño).
7. Ingrese los tamaños de los fragmentos de estándar de carril interno (bases de 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 y 500). Consulte la sección 9.C, figura 24.
8. Seleccione "OK" (Aceptar).

6.H. Cómo crear un estándar de tamaño con el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 3.2

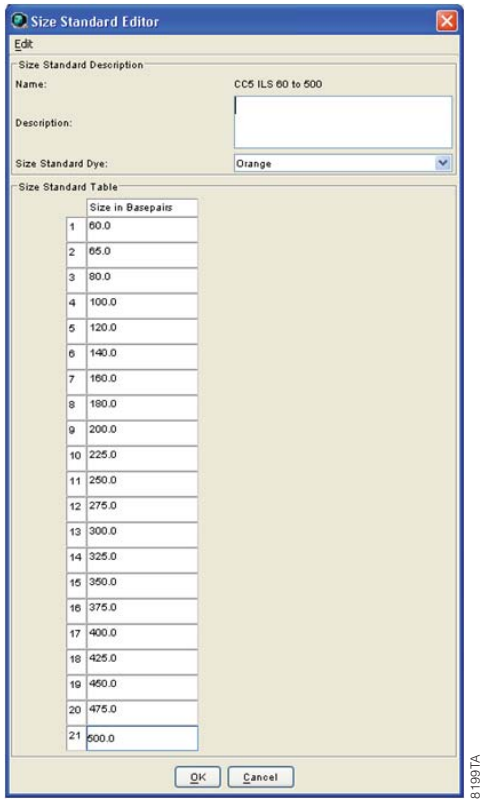

Figura 18. El "Size Standard Editor" (Editor de estándar de tamaño).

6.I. Cómo crear un método de análisis de casos con el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 3.2

Estas instrucciones siguen ligeramente el tutorial del software GeneMapper® *ID* de Applied Biosystems, páginas 5–11.

1. Seleccione "Tools" (Herramientas), luego "GeneMapper Manager" (Administrador de GeneMapper).
2. Seleccione la pestaña "Analysis Methods" (Métodos de análisis).
3. Seleccione "New" (Nuevo), y se abrirá un nuevo cuadro de diálogo de método de análisis.
4. Seleccione "HID", y seleccione "OK" (Aceptar).

   Nota: Si no visualiza la opción HID, usted no tiene el software GeneMapper® *ID*. Comuníquese con Applied Biosystems.
5. Ingrese un nombre descriptivo para el método de análisis, como por ejemplo, "PowerPlex Fusion".
6. Seleccione la pestaña "Allele" (Alelo) (figura 19).

7. Seleccione el archivo de texto de intervalos que se importó en la sección 6.F.

8. Asegúrese de que la casilla "Use marker-specific stutter ratio if available" (Utilizar proporción de repeticiones de marcador específico, si está disponible) esté marcada.

9. Ingrese los valores mostrados en la figura 19 para un correcto filtrado de los picos de las repeticiones cuando se utiliza el PowerPlex® Fusion System. Para obtener una explicación del uso correcto y los efectos de estas configuraciones, consulte el boletín del usuario de Applied Biosystems denominado "*Procedimientos de instalación y nuevas características para el software GeneMapper* ID *3.2*".

   Nota: Algunas configuraciones se optimizaron y son diferentes de las configuraciones recomendadas en el boletín del usuario.

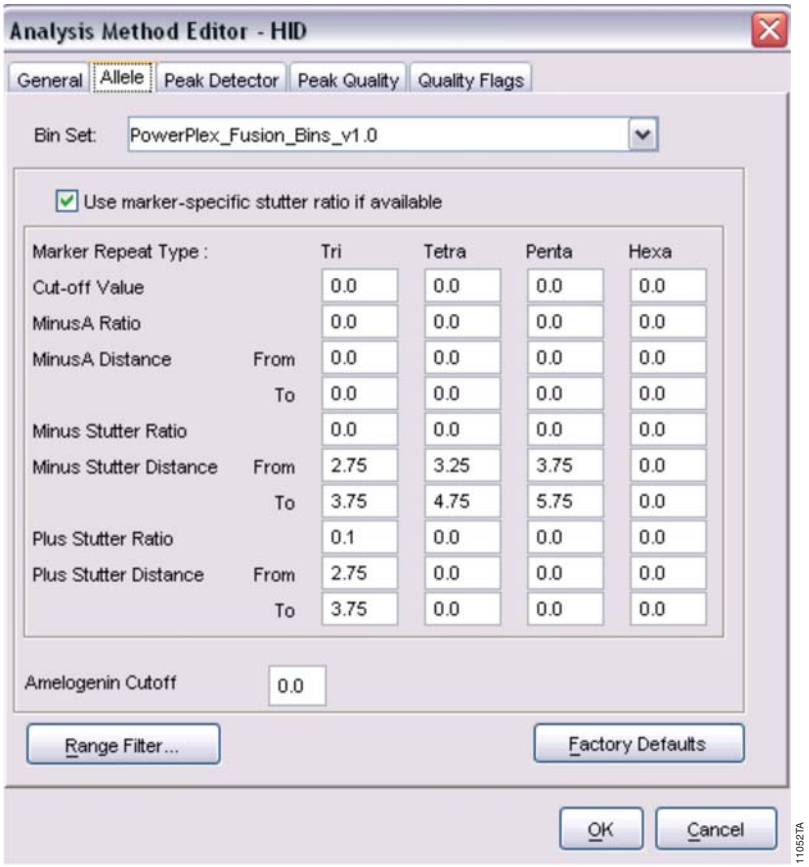

Figura 19. La pestaña "Alelle" (Alelo) del GeneMapper® *ID*.

10. Seleccione la pestaña "Peak Detector" (Detector de picos). Recomendamos las configuraciones mostradas en la figura 20.

    Notas:

    1. Seleccione el rango completo o un rango parcial para el rango de análisis. Cuando se utiliza un rango parcial, elija un rango de análisis apropiado según sus datos. Elija un punto de inicio después del pico de imprimación y antes del primer pico del estándar de carril interno definido para ayudar a asegurar el tamaño correcto del estándar de carril interno.
    2. Los umbrales de amplitud del pico son las alturas del pico mínimas a las que el software considerará pico. Los valores para los umbrales de amplitud de pico son generalmente de 50–150 RFU y deben ser determinados por los laboratorios individuales. Las alturas de pico para el CC5 ILS 500 son generalmente inferiores a las de los otros tintes. Por lo tanto, el umbral del tinte naranja puede ser inferior al de los otros tintes.

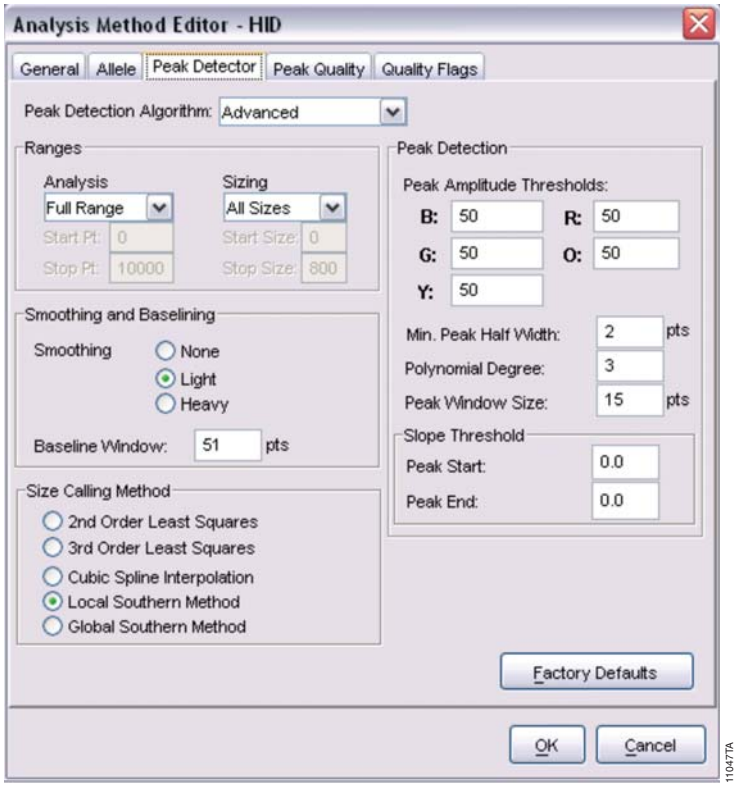

Figura 20. La pestaña "Peak Detector" (Detector de picos) del GeneMapper® *ID*.

11. Seleccione la pestaña "Peak Quality" (Calidad de picos). Puede cambiar las configuraciones para la calidad de picos.

Nota: Para los pasos 11 y 12, consulte el manual de usuario de GeneMapper® *ID* para obtener información.

12. Seleccione la pestaña "Quality Flags" (Indicadores de calidad). Puede cambiar estas configuraciones.

13. Seleccione "OK" (Aceptar) para guardar sus configuraciones.

6.I. Cómo crear un método de análisis de casos con el software GeneMapper® *ID*-X, Versión 3.2 (continuación)

Cómo procesar los datos para las muestras de casos

1. Seleccione "File" (Archivo), luego "New Project" (Nuevo proyecto).

2. Seleccione "Edit" (Editar), luego "Add Samples to Project" (Agregar muestras al proyecto).

3. Busque la ubicación de los archivos de ejecución. Resalte los archivos deseados, luego seleccione "Add to list" (Agregar a la lista) seguido por "Add" (Agregar).

4. En la columna "Sample Type" (Tipo de muestra), utilice el menú desplegable para seleccionar "Ladder" (Escalera), "Sample" (Muestra), "Positive Control" (Control positivo) o "Negative Control" (Control negativo) según sea lo apropiado para la muestra. Cada carpeta en el proyecto debe contener al menos una inyección de escalera alélica designada como "Ladder" (Escalera) en la columna "Sample Type" (Tipo de muestra) para la determinación del genotipo correcto.

   Nota: El ADN de control positivo definido en el archivo del panel GeneMapper® *ID* es el ADN de control 2800M. Redefina el genotipo en el archivo del panel si utiliza un ADN de control positivo diferente.

5. En la columna "Analysis Method" (Método de análisis), seleccione el método de análisis creado anteriormente en esta sección.

6. En la columna "Panel", seleccione el archivo de texto de paneles que se importó en la Sección 6.F.

7. En la columna "Size Standard" (Estándar de tamaño), seleccione el estándar de tamaño que se importó en la Sección 6.G o se creó en la Sección 6.H.

8. Seleccione "Analyze" (Analizar, el botón de flecha verde) para comenzar el análisis de datos.

Nota: El tamaño de los alelos Penta E y DYS391 de bases ≥ 475 no utilizará el Método local del sur. Para Penta E, los alelos >24 se etiquetarán como "OL".

6.J. Cómo crear una base de datos o método de análisis de paternidad con el software GeneMapper® *ID*, Versión 3.2

1. Seleccione "Tools" (Herramientas), luego "GeneMapper Manager" (Administrador de GeneMapper).
2. Seleccione la pestaña "Analysis Methods" (Métodos de análisis).
3. Seleccione "New" (Nuevo), y se abrirá un nuevo cuadro de diálogo de método de análisis.
4. Seleccione "HID", y seleccione "OK" (Aceptar).

   Nota: Si no visualiza la opción HID, usted no tiene el software GeneMapper® *ID*. Comuníquese con Applied Biosystems.
5. Ingrese un nombre descriptivo para el método de análisis, como por ejemplo, "PowerPlex_Fusion_20%filter".
6. Seleccione la pestaña "Allele" (Alelo) (figura 21).
7. Seleccione el archivo de texto de intervalos que se importó en la sección 6.F.
8. Asegúrese de que la casilla "Use marker-specific stutter ratio if available" (Utilizar proporción de repeticiones de marcador específico, si está disponible) esté marcada.
9. Ingrese los valores mostrados en la figura 21 para un correcto filtrado de los picos cuando se utiliza el PowerPlex® Fusion System. Para obtener una explicación del uso correcto y los efectos de estas configuraciones, consulte el boletín del usuario de Applied Biosystems denominado "*Procedimientos de instalación y nuevas características para el software GeneMapper* ID *3,2*".

   Nota: Asegúrese de que el filtro de 20% apropiado se aplique en este método de análisis ingresando "0,20" para el valor global límite para las repeticiones de Tri, Tetra y Penta.

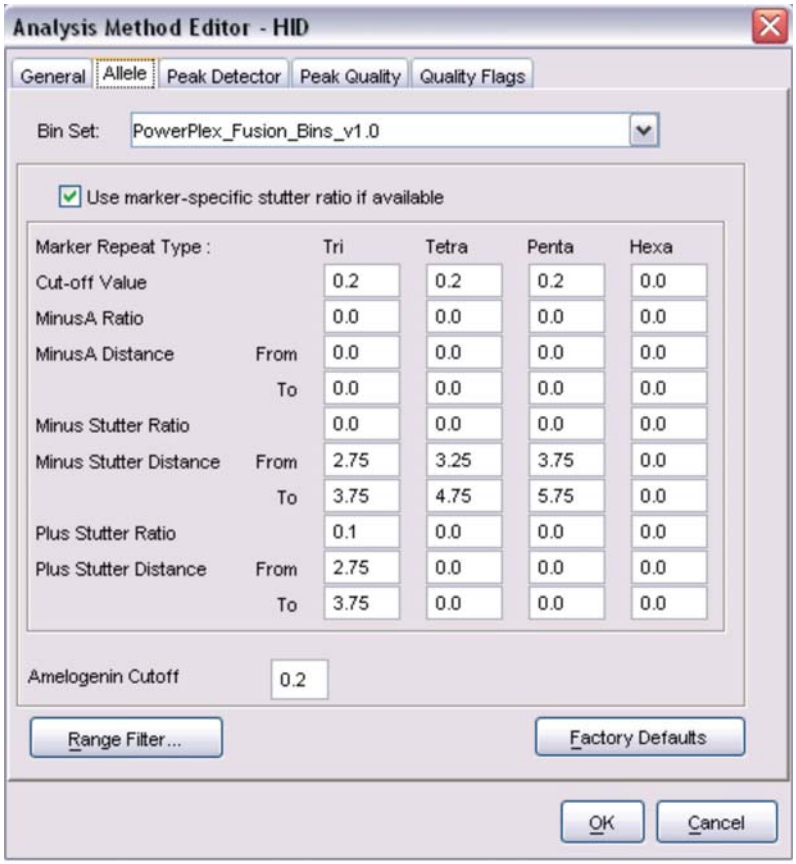

Figura 21. La pestaña "Allele" (Alelo) del GeneMapper® *ID* con las configuraciones para utilizar un filtro de picos del 20%.

10. Seleccione la pestaña "Peak Detector" (Detector de picos). Recomendamos las configuraciones mostradas en la figura 20.

    Notas:

    1. Seleccione el rango completo o un rango parcial para el rango de análisis. Cuando se utiliza un rango parcial, elija un rango de análisis apropiado según sus datos. Elija un punto de inicio después del pico de imprimación y antes del primer pico del estándar de carril interno definido para ayudar a asegurar el tamaño correcto del estándar de carril interno.
    2. Los umbrales de amplitud del pico son las alturas del pico mínimas a las que el software considerará pico. Los valores para los umbrales de amplitud de pico son generalmente de 50–150 RFU y deben ser determinados por los laboratorios individuales. Las alturas de pico para el CC5 ILS 500 son generalmente inferiores a las de los otros tintes. Por lo tanto, el umbral del tinte naranja puede ser inferior al de los otros tintes.

11. Seleccione la pestaña "Peak Quality" (Calidad de picos). Puede cambiar las configuraciones para la calidad de picos.

    Nota: Para los pasos 11 y 12, consulte el manual de usuario de GeneMapper® *ID* para obtener información.

6.J. Cómo crear una base de datos o método de análisis de paternidad con el software GeneMapper® *ID*, Versión 3.2 (continuación)

12. Seleccione la pestaña "Quality Flags" (Indicadores de calidad). Puede cambiar estas configuraciones.
13. Seleccione "OK" (Aceptar) para guardar sus configuraciones.

Cómo procesar datos para la base de datos o muestras de paternidad

1. Seleccione "File" (Archivo), luego "New Project" (Nuevo proyecto).
2. Seleccione "Edit" (Editar), luego "Add Samples to Project" (Agregar muestras al proyecto).
3. Busque la ubicación de los archivos de ejecución. Resalte los archivos deseados, luego seleccione "Add to list" (Agregar a la lista) seguido por "Add" (Agregar).
4. En la columna "Sample Type" (Tipo de muestra), utilice el menú desplegable para seleccionar "Ladder" (Escalera), "Sample" (Muestra), "Positive Control" (Control positivo) o "Negative Control" (Control negativo) según sea lo apropiado para la muestra. Cada carpeta en el proyecto debe contener al menos una inyección de escalera alélica designada como "Ladder" (Escalera) en la columna "Sample Type" (Tipo de muestra) para la determinación del genotipo correcto.

   Nota: El ADN de control positivo definido en el archivo del panel GeneMapper® *ID* es el ADN de control 2800M. Redefina el genotipo en el archivo del panel si utiliza un ADN de control positivo diferente.
5. En la columna "Analysis Method" (Método de análisis), seleccione el método de análisis creado anteriormente en esta sección.
6. En la columna "Panel", seleccione el archivo de texto de paneles que se importó en la Sección 6.F.
7. En la columna "Size Standard" (Estándar de tamaño), seleccione el estándar de tamaño que se importó en la Sección 6.G o se creó en la Sección 6.H.
8. Seleccione "Analyze" (Analizar) (botón de flecha verde) para comenzar el análisis de datos.

Nota: El tamaño de los alelos Penta E y DYS391 de bases ≥ 475 no utilizará el Método local del sur. Para Penta E, los alelos >24 se etiquetarán como "OL".

6.K. Controles

1. Observe los resultados para el control negativo. Con los protocolos definidos en este manual, el control negativo debe quedar exento de productos de amplificación.
2. Observe los resultados para el ADN de control 2800M. Compare los tamaños de repetición alélica del ADN de 2800M con la escalera alélica específica del locus. Las designaciones alélicas del ADN de 2800M esperadas para cada locus están enumeradas en la tabla 6 (sección 9.A).

6.L. Resultados

Los resultados representativos del PowerPlex® Fusion System aparecen en la figura 22. La mezcla para escalera alélica PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix se muestra en la figura 23.

Artefactos y repeticiones

Los productos de las repeticiones son un artefacto de amplificación común asociado con el análisis de las STR. Los productos de las repeticiones a menudo presentan una unidad de repetición por debajo del pico verdadero del alelo y, ocasionalmente, dos unidades de repetición más pequeñas o una unidad de repetición más grande que el pico verdadero del alelo. Frecuentemente, los alelos con un mayor número de unidades de repetición exhibirán una repetición de porcentaje más elevado. Un locus repetido tirinucleótido, como el D22S1045, tendrá una repetición más pronunciada tanto en la posición n–3 como en la n+3 de lo que tiene un locus repetido tetranucleótido típico. El patrón y la intensidad de las repeticiones pueden diferir levemente entre los conjuntos de imprimación para los mismos locus.

En cada locus, el promedio más tres desviaciones estándar es la medida utilizada tanto en el archivo de texto de paneles del PowerPlex® Fusion para el filtrado específico del locus en el software GeneMapper® *ID*, versión 3.2 como en el archivo de texto de repeticiones PowerPlex® Fusion para el filtrado específico del locus en el software GeneMapper® *ID*-X.

Además de los picos de las repeticiones, se pueden observar otros picos de artefactos en algunos lugares del PowerPlex® Fusion System. Se pueden ver productos de nivel bajo en las posiciones n-2 y n+2 con algunos locus, como por ejemplo D1S1656, D13S317, D18S51, D21S11, D7S820, D5S818, D12S391 y D19S433. A veces aparecen picos N-1 en la amelogenina y en D2S441. A veces aparecen picos N-3 en D12S391. Se pueden ver picos de distorsión en el canal de fluoresceína en bases de 64–65; en el canal JOE en bases de 70 ; en el canal TMR en bases de 65–67; y en el canal CXR en bases de 58–65.

El PowerPlex® Fusion System está optimizado para usarse con polímero POP-4™. Este sistema no se desarrolló para usarse con el polímero POP-7; si se usa con el polímero POP-7™, se requiere optimización y validación interna. No se han notado algunos artefactos independientes de ADN específicos para el PowerPlex® Fusion System con polímero POP-7™. Los filtros globales utilizados para análisis de base de datos filtrarán generalmente estos picos de artefactos. Los picos de artefactos pueden verse en el canal de fluoresceína en bases de 74–76, bases de 85–87 y bases de 99–101. En el canal JOE, a los artefactos se les puede ver en bases de 88–90. La fuerza de la señal del artefacto de canal JOE aumenta con el almacenamiento de la placa de amplificación a 4 °C, más comúnmente cuando se dejan las placas a 4 ºC durante algunos días. Recomendamos almacenar los productos de amplificación a -20 ºC.

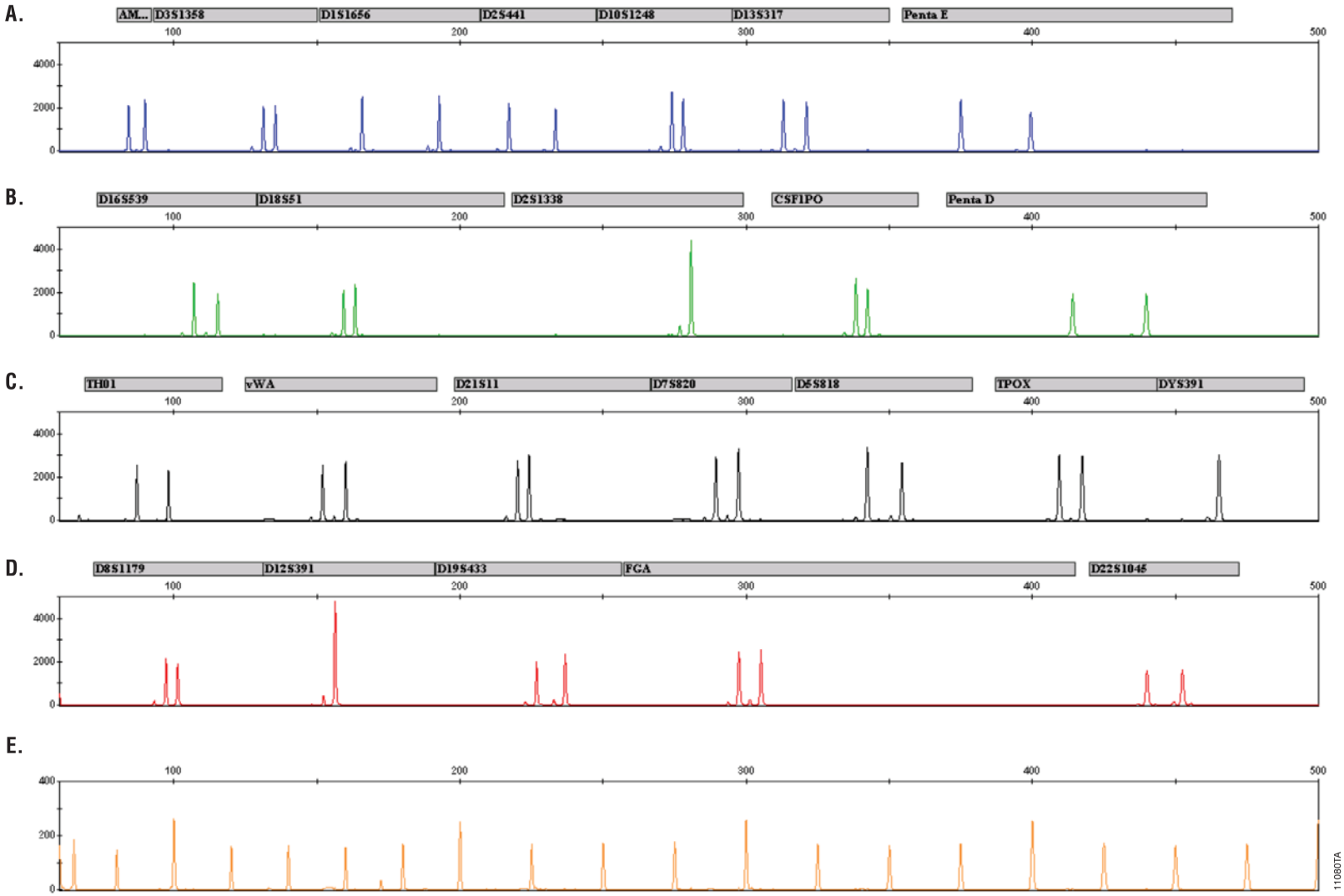

Figura 22. El PowerPlex® Fusion System. Una plantilla de ADN de una única fuente (0,5 ng) se amplificó al utilizar el PowerPlex® Fusion System y 30 ciclos. Los productos de amplificación se mezclaron con el CC5 Internal Lane Standard 500 y se analizaron con un Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer utilizando una inyección de 3 kV de 5 segundos. Los resultados se analizaron utilizando el software GeneMapper® *ID*, versión 3.2. **Panel A.** Un electroferograma que muestra los picos de los locus etiquetados por fluoresceína: Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317 y Penta E. **Panel B.** Un electroferograma que muestra los picos de los locus etiquetados por JOE: D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO y Penta D. **Panel C.** Un electroferograma que muestra los picos de los locus etiquetados por TMR-ET: TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX y DYS391. **Panel D.** Un electroferograma que muestra los picos de los locus etiquetados por CXR-ET: D8S1179, D12S391, D19S433, FGA y D22S1045. **Panel E.** Un electroferograma que muestra fragmentos entre 60 bp y 500 bp del CC5 Internal Lane Standard 500.

AMEL
D3S1358
D16S539
D18S51
TH01
vWA
D21S11
D8S1179
D12S391
D19S433
FGA
D22S1045
D5S818
D13S317
Penta E
D7S820
CSF1PO
Penta D
TPOX
D2S441
D2S1338
D1S1248
D16S539
D18S51
D21S11
D7S820
CSF1PO
D5S818
D13S317
Penta E
D8S1179
D12S391
D19S433
FGA
D22S1045
TPOX
D3S1358
D1S1656
D2S441
D2S1338
D1S1248
D13S317
Penta E
D5S818
D7S820
CSF1PO
Penta D
TH01
vWA
D21S11
D18S51
D16S539

7. Resolución de problemas

Si tiene preguntas que no se hayan resuelto aquí, comuníquese con su oficina local de Promega o con su distribuidor. La información de contacto está disponible en: **www.promega.com**. Correo electrónico: **genetic@promega.com**

7.A. Amplificación y detección de fragmentos

Esta sección proporciona información sobre la amplificación y la detección generales. Si tiene preguntas sobre amplificación de ADN extraído, consulte la Sección 7.B. Para obtener información sobre la amplificación directa, consulte las Secciones 7.C y 7.D.

Síntomas	Causas y comentarios
Picos de alelos débiles o ausentes	La mezcla PowerPlex® Fusion 5X Master Mix no se agitó bien antes de utilizarla. Agite la mezcla 5X Master Mix durante 15 segundos antes de distribuirla en la mezcla de amplificación de la PCR.
	Se formó una burbuja de aire en el fondo del tubo de reacción. Utilice una pipeta para retirar la burbuja de aire, o centrifugue brevemente las reacciones antes del ciclo térmico.
	Problemas del termociclador, placa o tubo. Revise el protocolo del termociclador en la sección 4. No hemos evaluado otros tubos de reacción, placas ni termocicladores. Calibre el calentador del termociclador, si es necesario.
	La concentración de la imprimación fue demasiado baja. Utilice la concentración de la imprimación recomendada. Agite la mezcla PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix durante 15 segundos antes de utilizarla.
	Inyección de electroforesis capilar insuficiente (los picos CC5 ILS 500 también se vieron afectados). Reinyecte la muestra. Verifique el sistema de bombeo de la jeringa para comprobar si hay fugas. Verifique la potencia del láser.
	Las muestras no se desnaturalizaron por completo. Desnaturalice las muestras por calor para el tiempo recomendado, luego enfríe sobre hielo picado o en un baño de hielo de inmediato antes de la electroforesis capilar. No enfríe las muestras en un termociclador configurado a 4 °C, ya que puede conducir a artefactos debidos a la recocción del ADN.
	Se utilizó formamida de mala calidad. Utilice sólo formamida Hi-Di™ cuando analice muestras.
Picos adicionales visibles en un todos los canales de color	Contaminación con ADN de otra plantilla o previamente o ADN amplificado. La contaminación cruzada puede ser un problema. Utilice puntas para pipetas resistentes al aerosol, y cámbiese los guantes con frecuencia.
	Las muestras no se desnaturalizaron por completo. Desnaturalice las muestras por calor para el tiempo recomendado, y enfríe sobre hielo picado o en un baño de hielo de inmediato antes de cargar el capilar.
	El ADN de doble cadena migra más rápido que el ADN de una cadena durante la electroforesis capilar. La aparición de picos "sombra" que migran por delante de los picos principales, especialmente si los picos sombra están separados por la misma distancia que los picos principales en

Síntomas	Causas y comentarios
	los heterocigotas, puede indicar la presencia de ADN de doble cadena debido a una desnaturalización incompleta o recocción posterior a la inyección.
	Artefactos de amplificación de STR. La amplificación de STR puede dar como resultado artefactos que aparecen como picos de una base más pequeña que el alelo debido a la incorporación incompleta en el residuo de 3´ A. Asegúrese de realizar un paso de extensión (10 minutos para las muestras de ADN purificado) a 60 ºC después del ciclo térmico (sección 4).
Picos adicionales visibles en un o todos los canales de color (continuación)	Artefactos relacionados con CE ("puntas"). Los cambios menores de voltaje o los cristales de urea que pasan por el láser pueden provocar "puntas" o picos inesperados. Las puntas a veces aparecen en un color, pero a menudo son identificadas fácilmente por su presencia en más de un color. Reinyecte las muestras para confirmar.
	El espectral G5 incorrecto estuvo activo. Vuelva a ejecutar las muestras, y confirme que el espectral G5 de 5 tintes PowerPlex® esté configurado para G5. Consulte las instrucciones sobre la preparación del instrumento en la sección 5.
	Levante o sangrado. El levante puede ocurrir cuando las alturas de los picos son demasiado altas o si una matriz insuficiente o incorrecta se aplica a las muestras. • Realice una nueva calibración espectral y vuelva a ejecutar las muestras. • Las sensibilidades del instrumento pueden variar. Optimice las condiciones de inyección. Consulte la sección 5.
	Artefactos relacionados con CE (contaminantes). Los contaminantes en el agua utilizada con el instrumento o para diluir el buffer 10X del analizador genético pueden generar picos en el canal de fluoresceína y el canal JOE. Utilice agua desionizada en autoclave, cambie los viales y lave el reservorio del buffer.
	Repita la preparación de la muestra utilizando formamida nueva. El almacenamiento a largo plazo de la muestra amplificada en formamida puede provocar su degradación.
	El polímero CE excedió su fecha de vencimiento o el polímero estuvo almacenado a una temperatura ambiente durante más de una semana.
	Realice un mantenimiento diario o semanal de los instrumentos como lo recomienda el fabricante.
	Artefactos relacionados con POP-7™. Este sistema no se desarrolló para usarse con el polímero POP-7; si se usa con el polímero POP-7™, se requiere optimización y validación interna. El uso del polímero CE POP-7™ puede cambiar la migración y ubicación por tamaño de los artefactos en comparación con las ubicaciones de POP-4™. A un artefacto se le puede ver con el polímero POP-7™ en 88–90bp en el canal JOE y en 74–76, 85–87 o 99–101bp en el canal de fluoresceína.

7.A. Amplificación y detección de fragmentos (continuación)

Síntomas	Causas y comentarios
No funciona la escalera alélica	La escalera alélica y la mezcla de par de imprimación no eran compatibles. Compruebe la misma que las muestras que la escalera alélica proviene del mismo kit que la mezcla de par de imprimación.
	Formamida de mala calidad. Utilice sólo formamida Hi-Di™ cuando analice muestras.
	Asegúrese de que la escalera alélica y las muestras provienen de la misma ejecución del instrumento.
	La migración de las muestras cambió levemente durante el curso de una ejecución de CE con varias muestras. Esto puede deberse a los cambios en la temperatura o en la columna de CE con el tiempo. Utilice una inyección diferente de escalera alélica para determinar los tamaños.
	Inyección insuficiente de escalera alélica. Incluya más de una escalera por ejecución del instrumento.
	El estándar de tamaño interno no se asignó correctamente. Evalúe los rótulos de tamaño en el CC5 ILS 500 y corrija, de ser necesario.
Falta de equilibrio de la altura de picos	El volumen de la reacción fue demasiado bajo. Este sistema está optimizado para un volumen final de reacción de 25 µl con el fin de superar los inhibidores presentes en las muestras de ADN. La disminución del volumen de la reacción puede dar como resultado un rendimiento de calidad inferior.
	Problemas de equilibrio varios. Descongele las mezclas 5X Primer Pair Mix y 5X Master Mix por completo, y agite durante 15 segundos antes de usar. Tenga en cuenta que la 5X Master Mix tardará más en descongelarse que la 5X Primer Pair Mix. No centrifugue la 5X Primer Pair Mix ni la 5X Master Mix después de mezclar. Calibre los termocicladores y las pipetas de la manera habitual.
	La mezcla de amplificación de la PCR preparada en la sección 4 no se mezcló bien. Agite la mezcla de amplificación de la PCR durante 5–10 segundos antes de distribuirla en los tubos o en la placa de reacción.

7.B. Amplificación de ADN extraído

La siguiente información es específica para la amplificación de ADN extraído. Para obtener información sobre la amplificación y la detección generales, consulte la sección 7.A.

Síntomas	Causas y comentarios
Picos de alelos débiles o ausentes	Plantilla de ADN impuro. Debido a la pequeña cantidad de plantilla utilizada, esto es rara vez un problema. Según el procedimiento de extracción de ADN utilizado y la fuente de la muestra, podrían aparecer inhibidores en la muestra de ADN.
	Plantilla insuficiente. Utilice la cantidad recomendada de plantilla de ADN, si está disponible.
	Alta concentración de sal o pH alterado. Si la plantilla de ADN está almacenada en un buffer TE que no tiene pH 8,0 o contiene una concentración de EDTA más alta, el volumen de ADN no

Síntomas	Causas y comentarios
	debe superar el 20% del volumen total de la reacción. El arrastre de K^+, Na^+, Mg^{2+} o EDTA de la muestra de ADN puede afectar negativamente a la PCR. Un cambio en el pH también puede afectar a la PCR. Almacene el ADN en un buffer TE^{-4} (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,1 mM EDTA) o buffer TE^{-4} con 20 µg/ml de glucógeno.
	El volumen de la reacción fue demasiado bajo. Este sistema se optimizó para un volumen final de reacción de 25 µl. La disminución del volumen de la reacción puede dar como resultado un rendimiento de calidad inferior.
Picos adicionales visibles en un o todos los canales de colores	Artefactos de amplificación de STR. La amplificación de cantidades excesivas de ADN purificado puede dar como resultado un número más alto de picos de artefacto. Utilice la cantidad recomendada de plantilla de ADN. Consulte la sección 6.L para obtener información adicional sobre repeticiones y artefactos.
Falta de equilibrio de la altura de picos	Cantidad excesiva de ADN. La amplificación de >0,5 ng de plantilla puede dar como resultado una falta de equilibrio, con locus más pequeños que muestran más producto que los locus más grandes. Disminuya el número de ciclos.
	Muestra de ADN degradado. La plantilla de ADN se degradó, y locus más grandes mostraron una producción disminuida.
	Plantilla de ADN insuficiente. Utilice la cantidad recomendada de plantilla de ADN, si está disponible. Puede haber efectos estocásticos cuando se amplifican cantidades bajas de plantilla.
	Plantilla de ADN impuro. Los inhibidores que pueden estar presentes en las muestras forenses pueden provocar que el alelo se retire o no tenga equilibrio.

7.C. Amplificación directa de ADN de los perforadores de tarjetas de almacenamiento

La siguiente información es específica para la amplificación directa del ADN de las tarjetas perforadas de almacenamiento. Para obtener información adicional sobre la amplificación y la detección generales, consulte la sección 7.A.

Síntomas	Causas y comentarios
Picos de alelos débiles o ausentes	El volumen de la reacción fue demasiado bajo. Este sistema está optimizado para un volumen final de reacción de 25 µl con el fin de superar los inhibidores presentes en las tarjetas FTA® y las muestras de ADN. La disminución del volumen de la reacción puede dar como resultado un rendimiento de calidad inferior.
	Transferencia de muestra insuficiente a la tarjeta de almacenamiento o muestra variable de la tarjeta de almacenamiento. Tome las perforaciones de una parte diferente de la tarjeta. Aumentar el número de ciclos puede mejorar las alturas de los picos bajos.
	El ADN no era accesible o material no lítico. Materiales no FTA previamente tratados con PunchSolution™ Reagent para garantizar que se libre el ADN de las proteínas celulares.

7.C. Amplificación directa de ADN de las tarjetas perforadas de almacenamiento (continuación)

Síntomas	Causas y comentarios
	Demasiada muestra en la reacción. Utilice una o dos perforaciones de tarjetas de almacenamiento de 1,2 mm. Siga las recomendaciones del fabricante cuando deposite la muestra en la tarjeta de almacenamiento. Con las tarjetas FTA®, reducir los volúmenes de la reacción por debajo de 25 µl puede provocar una falla en la amplificación.
	El control positivo no amplificó. No incluya una perforación de almacenamiento en blanco en las reacciones de control positivo. La presencia de perforaciones en blanco puede inhibir la amplificación del ADN de control 2800M.
Picos adicionales visibles en un o todos los canales de color	La perforación puede estar contaminada. Tome las perforaciones de un papel en blanco entre muestras.
	Artefactos de amplificación de STR. La amplificación directa de >20 ng de la plantilla puede dar como resultado un número más alto de picos de artefacto. Utilice el tamaño y el número de perforación recomendados. Consulte la sección 6.L para obtener información adicional sobre repeticiones y artefactos.
	Artefactos de amplificación de STR. La amplificación de STR puede dar como resultado artefactos que aparecen como picos de una base más pequeña que el alelo debido a la incorporación incompleta en el residuo de 3´ A. • Asegúrese de realizar un paso de extensión de 20 minutos a 60 ºC después del ciclo térmico (sección 4.B). • Disminuya el número de ciclos. • Aumente el tiempo de extensión final.
Falta de equilibrio de altura de picos	Cantidad excesiva de ADN. La amplificación de >20 ng de la plantilla puede dar como resultado una falta de equilibrio, con locus más pequeños que muestran más producto que los locus más grandes. • Utilice una o dos perforaciones de 1,2 mm de una tarjeta de almacenamiento que contenga una muestra bucal o una perforación de una tarjeta de almacenamiento de 1,2 mm que contenga sangre entera. Siga las recomendaciones del fabricante cuando deposite la muestra en la tarjeta de almacenamiento. • Disminuya el número de ciclos.
	El volumen de la reacción fue demasiado bajo. Este sistema está optimizado para un volumen final de reacción de 25 µl con el fin de superar los inhibidores presentes en las tarjetas FTA® y el PunchSolution™ Reagent. La disminución del volumen de la reacción puede dar como resultado un rendimiento de calidad inferior.
	La amplificación se inhibió cuando se utilizó más de una perforación de tarjeta de almacenamiento con sangre. Utilice sólo una perforación de 1,2 mm de tarjeta de almacenamiento con sangre.

Síntomas	Causas y comentarios
Falta de equilibrio de la altura picos (continuación)	El ADN no era accesible o material no lítico. Los locus de pequeños pueden amplificarse preferencialmente y descartar los locus grandes. Materiales no FTA previamente tratados con PunchSolution™ Reagent para garantizar que se libre el ADN de las proteínas celulares.

7.D Amplificación directa de ADN de los hisopos

La siguiente información es específica para la amplificación directa de ADN de los hisopos después del pretratamiento con el SwabSolution™ Kit. Para obtener información adicional sobre la amplificación y la detección generales, consulte la sección 7.A.

Síntomas	Causas y comentarios
Picos de alelos débiles o ausentes y recolección de las células	Acumulación insuficiente de la muestra. El desprendimiento fue variable. Aumente el número de ciclos del donante.
	SwabSolution™ Reagent inactivo. Descongele el SwabSolution™ Reagent por completo en baño María a 37 °C y mezcle al invertirlo suavemente. Almacene el SwabSolution™ Reagent a 2–10 °C. No almacene los reactivos en la puerta del refrigerador, en donde puede fluctuar la temperatura. No vuelva a refrigerar; evite varios ciclos de congelamiento-descongelamiento, ya que esto puede reducir la actividad.
	SwabSolution™ Reagent activo arrastrado hacia la reacción de amplificación. Asegúrese de que el calentador esté calentando a 70 °C (90 °C si se usa una placa profunda para pocillo cuadrado de 2,2 ml) y que las muestras se hayan incubado durante el periodo total de 30 minutos. La incubación durante periodos más cortos puede derivar en inactivación incompleta del reactivo. No use una incubadora colocada a 70 °C para incubar tubos o placas; la transferencia de calor es ineficiente y ocasionará mal desempeño. Use únicamente un calentador para mantener una transferencia de calor eficaz. Hemos sometido a pruebas los tiempos de incubación de 60 minutos y no observamos diferencia alguna en el desempeño en comparación con una incubación de 30 minutos.
	El ADN no era accesible o material no lítico. Materiales no FTA previamente tratados con SwabSolution™ Reagent para garantizar que se libre el ADN de las proteínas celulares.
Picos débiles o ausentes para la reacción de control positivo	Si falla en amplificarse la reacción de control positivo, revise para asegurarse de que se haya agregado la cantidad correcta de ADN de control 2800M a la reacción. Debido a los números de ciclo menores utilizados con extractos de hisopos, es necesario aumentar la masa de ADN de control 2800M para obtener un perfil. Recomendamos 10 ng de ADN de control 2800M por reacción de amplificación de 25 µl. Esta masa de ADN debe reducirse si el número de ciclos utilizados se aumenta y se debe disminuir si el número de ciclos aumenta. Aumente o disminuya al doble la masa de ADN de control de 2800M para cada disminución o incremento de un ciclo, respectivamente.
	Almacenamiento inadecuado del ADN de control 2800M.

7.D Amplificación directa de ADN de los hisopos (continuación)

Síntomas	Causas y comentarios
Picos adicionales visibles en uno o todos los canales de color	El extracto del hisopo estaba contaminado. Reúna una reacción que contenga el extracto de hisopo preparado a partir de un hisopo vacío o reúna una reacción en donde el SwabSolution™ Reagent se procese e incube como vacío sin hisopo.
	Artefactos de amplificación de STR. La amplificación de extractos de hisopo con altas concentraciones de ADN puede causar picos de artefactos debido a exceso de amplificación, lo que derivaría en saturación de la señal en el instrumento CE. Utilice 2 µl del extracto del hisopo recomendado por cada reacción de 25 µl. El uso de más de 2 µl en una reacción de 25 µl o el uso de 2 µl con un volumen de reacción menor puede derivar en exceso de amplificación y saturación de la señal. Si se satura la señal, repita la amplificación con menos extracto de hispo o un número menor de ciclos.
	Artefactos de amplificación de STR. La amplificación de STR puede dar como resultado artefactos que aparecen como picos de una base más pequeña que el alelo debido a la incorporación incompleta en el residuo de 3´ A. • Asegúrese de realizar el paso de extensión de 20 minutos a 60 ºC después del ciclo térmico (sección 4.C). • Utilice 2 µl del extracto del hisopo en una reacción de 25 µl del PowerPlex® Fusion. Un volumen mayor de extracto del hisopo puede contener más de la cantidad recomendada de plantilla de ADN, lo que da como resultado una adenilación incompleta. • Disminuya el número de ciclos. • Aumente el tiempo de extensión final.
Falta de equilibrio de la altura de picos	El exceso de ADN en la reacción de amplificación puede derivar en una falta tal de equilibrio de locus a locus dentro de un canal de tinte, que las alturas de picos en los locus más pequeños sean mayores que las de los locus más grandes (efecto de pendiente de esquí). Use menos extracto de hisopo o reduzca el número de ciclos.
	SwabSolution™ Reagent activo arrastrado desde los extractos de hisopo hacia la reacción de amplificación. Los locus más grandes son los más susceptibles al arrastre del reactivo y se dejarán fuera antes que los locus más pequeños. Asegúrese de que el calentador esté calentando a 70 °C (90 °C si se usan placas profunda para pocillo cuadrado de 2,2 ml) y que las muestras se hayan incubado durante el periodo total de 30 minutos. La incubación durante periodos más cortos puede derivar en inactivación incompleta del reactivo. No use una incubadora colocada a 70 °C para incubar tubos o placas. La transferencia de calor es ineficiente y derivará en un mal desempeño. Use únicamente un calentador para mantener una transferencia de calor eficaz.
	SwabSolution™ Reagent inactivo. Descongele el SwabSolution™ Reagent por completo en baño María a 37 °C y mezcle al invertirlo suavemente. Almacene el SwabSolution™ Reagent a 2–10 °C. No almacene los reactivos

Síntomas	Causas y comentarios
	en la puerta del refrigerador, en donde puede fluctuar la temperatura. No vuelva a refrigerar; evite varios ciclos de congelamiento-descongelamiento, ya que esto puede reducir la actividad.
	El ADN no era accesible o material no lítico. Los locus pequeños pueden amplificarse preferencialmente y descartar los locus grandes. Materiales no FTA previamente tratados con PunchSolution™ Reagent para garantizar que se libre el ADN de las proteínas celulares.

7.E. Software GeneMapper® *ID*-X

Síntomas	Causas y comentarios
Los picos de las repeticiones no se filtraron	El archivo de texto de repeticiones no se importó en el administrador de paneles cuando se importaron los archivos de texto de paneles e intervalos.
	Asegúrese de que la casilla "Use marker-specific stutter ratio and distance if available" (Utilizar proporción de repeticiones de marcador específico y distancia si está disponible) esté marcada.
	La distancia de las repeticiones no se definió en la pestaña "Allele" (Alelo) de "Analysis Method" (Método de análisis).
Las muestras en el proyecto no se analizaron	La ventana "Analysis Requirement Summary" (Resumen de requisitos de análisis) no estaba activada, y no se cumplió con un requisito de análisis. Active esa opción en el menú "Options" (Opciones), y corrija los requisitos de análisis necesarios para continuar el análisis.
Las ediciones en el visor de la edición de etiquetas no se pueden visualizar el proyecto.	Para visualizar las ediciones realizadas a un proyecto, primero se debe guardar. Cierre la ventana de visualización de gráficos, regrese a la página principal de GeneMapper® *ID*-X y guarde el proyecto. Muestre la ventana de gráficos de nuevo, luego visualice la tabla de edición de etiquetas.
La barra de encabezamiento del marcador para algunos lugares son grises.	Cuando se realiza una edición a un locus, los indicadores de calidad y la barra de encabezamiento del marcador cambian automáticamente al color gris. Para cambiar el GQ y la barra de encabezamiento del marcador de un locus al color verde, anule el GQ en la ventana de gráficos.
Alelos no definidos	Para analizar las muestras con el software GeneMapper® *ID*-X, se debe definir al menos una escalera alélica.
	Se definió un número insuficiente de fragmentos CC5 ILS 500. Asegúrese de definir al menos dos fragmentos CC5 ILS 500 más pequeños que el menor pico de muestra y al menos dos fragmentos CC5 ILS 500 más grandes que el mayor pico de muestra. En estas circunstancias, la escalera alélica debe haber fallado en la instancia de verificación de calidad.
	La ejecución fue demasiado breve, y los picos más grandes en el estándar de carril interno no se capturaron. No todos los picos CC5 ILS 500 definidos en el estándar de tamaño se detectaron durante la ejecución. • Cree un nuevo estándar de tamaño utilizando los fragmentos del estándar de carril interno presentes en la muestra. • Vuelva a ejecutar las muestras utilizando un tiempo de ejecución más prolongado.
	Se utilizó una escalera alélica de mala calidad durante el análisis. Asegúrese de que sólo se utilicen escaleras alélicas de alta calidad para el análisis.

7.E. Software GeneMapper® *ID*-X (continuación)

Síntomas	Causas y comentarios
Alelos fuera de la escalera	Se utilizó una escalera alélica de una ejecución diferente a las muestras. Vuelva a analizar las muestras con una escalera alélica de la misma ejecución.
	El software GeneMapper® *ID*-X requiere que la escalera alélica se importe de la misma carpeta donde se encuentra la muestra. Asegúrese de que la escalera alélica esté en la misma carpeta donde se encuentra la muestra. Cree un nuevo proyecto y vuelva a analizar, como se describe en la sección 6.D o 6.E.
	El archivo de texto de paneles seleccionado para el análisis no fue correcto para el sistema de STR utilizado. Asigne el archivo de texto de paneles correcto que corresponde al sistema de STR utilizado para la amplificación.
	La escalera alélica no se identificó como una escalera alélica en la columna de tipo de muestra.
	El estándar de carril interno no se identificó correctamente en la muestra. Vuelva a definir manualmente los tamaños de los fragmentos de estándar de tamaño en la muestra.
	Se utilizó una escalera alélica de mala calidad durante el análisis. Asegúrese de que sólo se utilicen escaleras alélicas de alta calidad para el análisis.
	Se utilizó una escalera alélica de una ejecución diferente a las muestras. Vuelva a analizar las muestras con una escalera alélica de la misma ejecución.
El estándar de tamaño no se denominó	El punto de partida de los datos no fue correcto para el rango parcial elegido correctamente en la Sección 6.E. Ajuste el punto de partida de los datos en el método de análisis. Alternativamente, utilice un rango completo para el análisis.
	Picos adicionales en el estándar de tamaño. Abra el "Size Match Editor" (Editor de coincidencia de tamaño). Resalte el pico adicional, seleccione "Edit" (Editar) y "delete size label" (Eliminar la etiqueta de tamaño). Seleccione "auto adjust sizes" (tamaños de ajuste automático).
	La ejecución fue demasiado breve, y los picos más grandes en el estándar de carril interno no se capturaron. No todos los picos CC5 ILS 500 definidos en el estándar de tamaño se detectaron durante la ejecución. • Cree un nuevo estándar de tamaño utilizando los fragmentos del estándar de carril interno presentes en la muestra. • Vuelva a ejecutar las muestras utilizando un tiempo de ejecución más prolongado.
Faltan picos en el estándar de tamaño	Si los picos están por debajo del umbral, disminuya el umbral de amplitud de picos en el método de análisis para el canal de color naranja, con el fin de incluir los picos.
	Si los picos son de mala calidad, vuelva a definir el estándar de tamaño para la muestra para saltarse estos picos.
Estado basal significativamente elevado	Calibración espectral insuficiente. Realice una nueva calibración espectral, y vuelva a ejecutar las muestras.
	El espectral G5 incorrecto estuvo activo. Vuelva a ejecutar las muestras, y confirme que el espectral G5 de 5 tintes PowerPlex® esté configurado para G5. Consulte las instrucciones sobre la preparación del instrumento en la sección 5.

Síntomas	Causas y comentarios
Alelos no definidos	Para analizar las muestras con el software GeneMapper® *ID*, tanto los parámetros del análisis como el estándar de tamaño deben tener seleccionado el tipo de análisis "Basic or Advanced" (Básico o avanzado). Si son diferentes, se puede obtener un error.
	Para analizar las muestras con el software GeneMapper® *ID*, se debe definir al menos una escalera alélica.
	Se definió un número insuficiente de fragmentos CC5 ILS 500. Asegúrese de definir al menos dos fragmentos CC5 ILS 500 más pequeño que el menor pico de muestra y al menos dos fragmentos CC5 ILS 500 más grande que el mayor pico de muestra.
	La ejecución fue demasiado breve, y los picos más grandes en el estándar de carril interno no se capturaron. No todos los picos CC5 ILS 500 definidos en el estándar de tamaño se detectaron durante la ejecución. • Cree un nuevo estándar de tamaño utilizando los fragmentos del estándar de carril interno presentes en la muestra. • Vuelva a ejecutar las muestras utilizando un tiempo de ejecución más prolongado.
	Se utilizó una escalera alélica de mala calidad durante el análisis. Asegúrese de que sólo se utilicen escaleras alélicas de alta calidad para el análisis.
Alelos fuera de la escalera	Se utilizó una escalera alélica de una ejecución diferente a las muestras. Vuelva a analizar las muestras con una escalera alélica de la misma ejecución.
	El software GeneMapper® *ID* requiere que la escalera alélica se importe de la misma carpeta donde se encuentra la muestra. Asegúrese de que la escalera alélica esté en la misma carpeta donde se encuentra la muestra. Cree un nuevo proyecto y vuelva a analizar como se describe en la sección 6.I o 6.J.
	El archivo de texto de paneles seleccionado para el análisis no fue correcto para el sistema de STR utilizado. Asigne el archivo de texto de paneles correcto que corresponde al sistema de STR utilizado para la amplificación.
	La escalera alélica no se identificó como una escalera alélica en la columna de tipo de muestra.
	Se eligió el tipo de análisis incorrecto para el método de análisis. Asegúrese de utilizar el tipo de análisis HID.
	El estándar de carril interno no se identificó correctamente en la muestra. Vuelva a definir manualmente los tamaños de los fragmentos de estándar de tamaño en la muestra.
	Se utilizó una escalera alélica de mala calidad durante el análisis. Asegúrese de que sólo se utilicen escaleras alélicas de alta calidad para el análisis.

Síntomas	Causas y comentarios
El estándar de tamaño no se denominó	El punto de partida de los datos no fue correcto para el rango parcial elegido correctamente en la Sección 6.I. Ajuste el punto de partida de los datos en el método de análisis. Alternativamente, utilice un rango completo para el análisis.
	Picos adicionales en el estándar de tamaño en modo avanzado. Abra el "Size Match Editor" (Editor de coincidencia de tamaño). Resalte el pico adicional, seleccione "Edit" (Editar) y "delete size label" (Eliminar la etiqueta de tamaño). Seleccione "auto adjust sizes" (tamaños de ajuste automático).
	La ejecución fue demasiado breve, y los picos más grandes en el estándar de carril interno no se capturaron. No todos los picos CC5 ILS 500 definidos en el estándar de tamaño se detectaron durante la ejecución. • Cree un nuevo estándar de tamaño utilizando los fragmentos del estándar de carril interno presentes en la muestra. • Vuelva a ejecutar las muestras utilizando un tiempo de ejecución más prolongado.
Faltan picos en el estándar de tamaño	Si los picos están por debajo del umbral, disminuya el umbral de amplitud de picos en el método de análisis para el canal de color naranja, con el fin de incluir los picos.
	Si los picos son de mala calidad, vuelva a definir el estándar de tamaño para la muestra para saltarse estos picos.
Mensaje de error: "Either panel, size standard or analysis method is invalid" (El panel, el estándar de tamaño o el método de análisis es inválido)	El estándar de tamaño y el método de análisis no estaban en el mismo modo ("Classic" vs. "Basic o Advanced" (Clásico versus Básico o avanzado). Asegúrese de que ambos archivos estén configurados en el mismo modo, ya sea en el modo clásico, básico o avanzado.
No se definieron alelos, pero no apareció ningún	El archivo de texto de paneles no se seleccionó para la muestra. En la columna Panel mensaje de error (Panel), seleccione el archivo de texto de paneles apropiado para el sistema de STR que se utilizó.
	No se seleccionó ningún estándar de tamaño. En la columna "Size Standard" (Estándar de tamaño), asegúrese de seleccionar el estándar de tamaño apropiado.
	El estándar de tamaño no se definió correctamente o faltan los picos de mayor tamaño. Vuelva a definir el estándar de tamaño para incluir solo los picos presentes en su muestra. Finalizar antes el análisis o utilizar tiempos breves de ejecución hará que falten los picos de escalera mayores. Esto causará una calidad de tamaño que se indicará con el color "rojo", y no se definirá ningún tamaño de alelo.
Mensaje de error: método de análisis. "Both the Bin Set used in the Analysis Method and the Panel must belong to the same Chemistry Kit" (Tanto el conjunto de intervalos utilizado en el método de análisis como el panel deben pertenecer al mismo kit de química).	Se eliminó el archivo de texto de intervalos asignado al En el GeneMapper Manager, seleccione la pestaña "Analysis Methods" (Métodos de análisis), y abra el método de análisis de interés. Seleccione la pestaña Allele (Alelo), y seleccione un archivo de texto de intervalos apropiado.

Síntomas	Causas y comentarios
	Se eligió el archivo de texto de intervalos incorrecto en la pestaña "Allele" (Alelo) del método de análisis. Asegúrese de elegir el archivo de texto de intervalos apropiado, como se muestra en la figura 19.
Estado basal significativamente elevado	Calibración espectral insuficiente. Realice una nueva calibración espectral, y vuelva a ejecutar las muestras.
	Utilice el método de análisis en el modo clásico. Utilizar el análisis en el modo clásico en las muestras puede dar como resultado estados basales con más ruido que aquellos analizados con el método de análisis en el modo básico o avanzado . Se recomiendan los métodos de análisis y los estándares de tamaño del modo avanzado.
	El espectral G5 incorrecto estuvo activo. Vuelva a ejecutar las muestras, y confirme que el espectral G5 de 5 tintes PowerPlex® esté configurado para G5. Consulte las instrucciones sobre la preparación del instrumento en la sección 5.
Mensaje de error después de intentar importar los archivos de texto "Unable to save panel data: java.SQLEException: ORA-00001: restricción única (IFA.CKP_NNN) violada".	Hubo un conflicto entre los diferentes conjuntos de paneles e intervalos para importar los archivos de texto de paneles e intervalos: archivos de texto. Verifique para asegurarse de que los archivos de intervalos se instalaron correctamente. Si no fue así, elimine todos los archivos de texto de paneles e intervalos, y vuelva a importar los archivos en orden diferente.
Picos de la escalera alélica configuraciones de análisis	No se utilizó el software GeneMapper® *ID*, o se utilizaron las de microsatélites en lugar de las configuraciones de análisis HID. El software GeneMapper® no utiliza los mismos algoritmos que el software GeneMapper® *ID* y no puede corregir las diferencias de tamaño utilizando la escalera alélica. Promega recomienda utilizar el software GeneMapper® *ID* para analizar las reacciones del PowerPlex®. Si utiliza el software GeneMapper® *ID*, versión 3.2, asegúrese de que el método de análisis seleccionado sea un método HID. Esto puede verificarse abriendo el método de análisis con el administrador de GeneMapper, y seleccionando luego la pestaña "General". El tipo de análisis no se puede cambiar. Si el método no es HID, se debe eliminar y se debe crear un nuevo método de análisis.

8. Referencias

1. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing with trimeric and tetrameric tandem repeats: Polymorphic loci, detection systems, and population genetics. In: *The Second International Symposium on Human Identification 1991*, Promega Corporation, 31-52.
2. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 746–56.
3. Edwards, A. *et al.* (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **12**, 241–53.
4. Warne, D. *et al.* (1991) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human b-actin related pseudogene 2 (actbp2) detected using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6980.
5. Ausubel, F.M. *et al.* (1996) Unit 15: The polymerase chain reaction. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley and Sons, NY.
6. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Chapter 14: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
7. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (1989) Erlich, H.A., ed., Stockton Press, New York, NY.
8. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (1990) Innis, M.A. *et al.*, eds., Academic Press, San Diego, CA.
9. Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd ed., Elsevier Academic Press, London.
10. Presley, L.A. *et al.* (1992) The implementation of the polymerase chain reaction (PCR) HLA DQ alpha typing by the FBI laboratory. In: *The Third International Symposium on Human Identification 1992*, Promega Corporation, 245–69.
11. Hartmann, J.M. *et al.* (1991) Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime Laboratory Digest* **18**, 44–75.
12. *Internal Validation of STR Systems Reference Manual* #GE053, Promega Corporation.
13. Kline, M.C. *et al.* (2005) Results from the NIST 2004 DNA quantitation study. *J. Forensic Sci.* **50**, 571–8.
14. Levinson, G. and Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 203–21.
15. Schlötterer, C. and Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 211–5.
16. Smith, J.R. *et al.* (1995) Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase. *Genome Res.* **5**, 312–7.
17. Magnuson, V.L. *et al.* (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by *Taq* DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping. *BioTechniques* **21**, 700–9.
18. Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R. (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2807–12.
19. Griffiths, R. *et al.* (1998) New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *Int. J. Legal Med.* **111**, 267–72.
20. Butler, J.M. (2006) Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* **51**, 253–65.
21. Hill, C.R. *et al.* (2008) Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *J. Forensic Sci.* **53**, 73–80.
22. Lu, D.J., Liu, Q.L and Zhao, H. (2011) Genetic data of nine non-CODIS STRs in Chinese Han population from Guangdong Province, Southern China. *Int. J. Legal Med.* **125**, 133–7.

23. Bär, W. *et al.* (1997) DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* **110**, 175–6.

24. Gill, P. *et al.* (1997) Considerations from the European DNA Profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Sci. Int.* **87**, 185–92.

25. Frégeau, C.J. *et al.* (1995) Characterization of human lymphoid cell lines GM9947 and GM9948 as intra- and interlaboratory reference standards for DNA typing. *Genomics* **28**, 184-97.

26. Mandrekar, P.V., Krenke, B.E. and Tereba, A. (2001) DNA IQ™: The intelligent way to purify DNA. *Profiles in DNA* **4**(3), 16.

27. Krenke, B.E. *et al.* (2005) Development of a novel, fluorescent, two-primer approach to quantitative PCR. *Profiles in DNA* **8**(1), 3–5.

9. Apéndice

9.A. Ventajas de utilizar los locus en el PowerPlex® Fusion System

Una sola reacción del PowerPlex® Fusion System amplifica todos los locus básicos requeridos para las bases de datos de CODIS EE. UU. y europeas (Tablas 4 ay 5). La tabla 6 enumera los alelos del PowerPlex® Fusion System revelados en las plantillas de ADN estándar habitualmente disponibles. Además, el locus DYS391 específicos para sexo masculino se incluye para identificar los resultados nulos de Y para amelogenina.

Hemos seleccionado cuidadosamente las imprimaciones para evitar o minimizar los artefactos, que incluyen aquellos asociados con las polimerasas de ADN, como por ejemplo la disminución repetida y la incorporación de nucleótidos terminales (14,15). La disminución repetida, a veces denominada "bandas n-4", "repeticiones" o "bandas sombra", se debe a la pérdida de una unidad de repetición durante la amplificación de ADN, variación somática dentro del ADN, o ambos. La cantidad de este artefacto observado depende principalmente del locus y de la secuencia de ADN que se amplificará.

La incorporación de nucleótidos terminales (16,17) ocurre cuando una polimerasa termoestable no comparable de ADN agrega un nucleótido, generalmente adenina, a los extremos de 3´ de fragmentos de ADN amplificados de manera independiente de la plantilla. La eficiencia con lo que esto ocurre varía con diferentes secuencias de imprimación. De esta manera, se observa a veces un pico de artefacto de una base más corta que lo esperado (por ej., falta la incorporación terminal). Hemos modificado las secuencias de imprimación y agregado un paso de extensión final a 60 ºC (18) a los protocolos de amplificación para proporcionar condiciones para completar esencialmente la incorporación de nucleótidos terminales cuando se utilizan las cantidades de plantilla de ADN recomendadas.

Tabla 4. Información específica del locus del PowerPlex® Fusion System.

Locus de las STR	Etiqueta	Ubicación cromosómica[1]	Secuencia repetida[2] 5´→ 3´
Amelogenina[3]	Fluoresceína	Xp22.1–22.3 e Y	NA
D3S1358	Fluoresceína	3p21.31 (45,557 Mb)	Complejo TCTA
D1S1656	Fluoresceína	1q42 (228,972 Mb)	Complejo TAGA
D2S441	Fluoresceína	2p14 (68,214 Mb)	TCTA
D10S1248	Fluoresceína	10q26.3 (130,567 Mb)	GGAA
D13S317	Fluoresceína	13q31.1 (81,62 Mb)	TATC
Penta E	Fluoresceína	15q26.2 (95,175 Mb)	AAAGA
D16S539	JOE	16q24.1 (84,944 Mb)	GATA
D18S51	JOE	18q21.33 (59,1 Mb)	AGAA (19)
D2S1338	JOE	2q35 (218,705 Mb)	TGCC/TTCC
CSF1PO	JOE	5q33.1 (149,436 Mb)	AGAT
Penta D	JOE	21q22.3 (43,88 Mb)	AAAGA
TH01	TMR-ET	11p15.5 (2,149 Mb)	AATG (19)
vWA	TMR-ET	12p13.31 (5,963Mb)	Complejo TCTA (19)
D21S11	TMR-ET	21q21.1 (19,476 Mb)	Complejo TCTA (19)
D7S820	TMR-ET	7q21.11 (83,433 Mb)	GATA
D5S818	TMR-ET	5q23.2 (123,139 Mb)	AGAT
TPOX	TMR-ET	2p25.3 (1,472 Mb)	AATG
DYS391	TMR-ET	Y	TCTA
D8S1179	CXR-ET	8q24.13 (125,976 Mb)	Complejo TCTA (19)
D12S391	CXR-ET	12p12 (12,341 Mb)	Complejo AGAT/AGAC
D19S433	CXR-ET	19q12 (35,109 Mb)	Complejo AAGG
FGA	CXR-ET	4q28 (155,866 Mb)	Complejo TTTC (19)
D22S1045	CXR-ET	22q12.3 (35,779 Mb)	ATT

[1]La información sobre la ubicación cromosómica de estos locus se puede encontrar en las referencias 20, 21 y 22, y en: **www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/chrom.htm**

[2]El informe de agosto de 1997 (23,24) de la Comisión de ADN de la Sociedad Internacional de Hemogenética Forense (ISFH) afirma: "1) para los locus de STR dentro de los genes que codifican, se utilizará la cadena que codifica y el motivo de la secuencia de repetición definida con el primer nucleótido de 5´ posible de un motivo de repetición; y 2) para los locus de STR no asociadas con un gen que codifica, se utilizará la primera entrada de la base de datos o la descripción de la literatura original".

[3]La amelogenina no es una STR, pero muestra una banda específica X de bases de 89 y una banda específica Y de bases de 95.

9.A. Ventajas de utilizar los locus en el PowerPlex® Fusion System (continuación)

Tabla 5. Información sobre la escalera alélica del PowerPlex® Fusion System.

Locus de las STR	Etiqueta	Rango de tamaño de los componentes de la escalera alélica[1,2] (bases)	Números repetidos de los componentes de la escalera alélica[3]
Amelogenina[4]	Fluoresceína	89, 95	X, Y
D3S1358	Fluoresceína	103–147	9–20
D1S1656	Fluoresceína	161–208	9–14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18, 18.3, 19, 19.3, 20.3
D2S441	Fluoresceína	214–250	8–17
D10S1248	Fluoresceína	256–280	8–19
D13S317	Fluoresceína	302–350	5–17
Penta E	Fluoresceína	371–466	5–24
D16S539	JOE	84–132	4–16
D18S51	JOE	134–214	7–10, 10.2, 11–13, 13.2, 14–27
D2S1338	JOE	224–296	10, 12, 14–28
CSF1PO	JOE	318–362	5–16
Penta D	JOE	377–450	2.2, 3.2, 5–17
TH01	TMR-ET	72–115	3–9, 9.3, 10–11, 13.3
vWA	TMR-ET	127–183	10–24
D21S11	TMR-ET	203–259	24, 24.2, 25, 25.2, 26–28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36–38
D7S820	TMR-ET	269–313	5–16
D5S818	TMR-ET	321–369	6–18
TPOX	TMR-ET	393–441	4–16
DYS391	TMR-ET	442–486	5–14, 16
D8S1179	CXR-ET	76–124	7–19
D12S391	CXR-ET	133–185	14–17, 17.3, 18, 18.3, 19–27
D19S433	CXR-ET	193–245	5.2, 6.2, 8–12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18, 18.2
FGA	CXR-ET	265–411	14–18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26–30, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 48.2, 50.2
D22S1045	CXR-ET	425–464	7–20

[1]La longitud de cada alelo en la escalera alélica ha sido confirmada por el análisis de secuencias.

[2]Cuando se utiliza un estándar de carril interno, como por ejemplo el CC5 Internal Lane Standard 500, los tamaños estimados de los componentes de la escalera alélica pueden diferir de aquellos que se enumeran. Esto ocurre porque las diferentes secuencias en la escalera alélica y los componentes del estándar de carril interno pueden provocar diferencias en la migración. La etiqueta de tinte y el enlazador también afectan la migración de los alelos.

[3]Para obtener una lista actual de microvariantes, consulte el Informe de alelos variantes publicado en el sitio web del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST) de Estados Unidos en: **www.cstl.nist.gov/div831/strbase/**

[4]La amelogenina no es una STR, pero muestra una banda específica X de bases de 89 y una banda específica Y de bases de 95.

Tabla 6. Las determinaciones de alelos del PowerPlex® Fusion System en las plantillas de ADN estándar habitualmente disponibles.

	Plantillas de ADN estándar[1]		
Locus de las STR	**2800 M**	**9947A**	**9948**
Amelogenina	X, Y	X, X	X, Y
D3S1358	17, 18	14, 15	15, 17
D1S1656	12, 13	18.3, 18.3	14, 17
D2S441	10, 14	10, 14	11, 12
D10S1248	13, 15	13, 15	12, 15
D13S317	9, 11	11, 11	11, 11
Penta E	7, 14	12, 13	11, 11
D16S539	9, 13	11, 12	11, 11
D18S51	16, 18	15, 19	15, 18
D2S1338	22, 25	19, 23	23, 23
CSF1PO	12, 12	10, 12	10, 11
Penta D	12, 13	12, 12	8, 12
TH01	6, 9.3	8, 9.3	6, 9.3
vWA	16, 19	17, 18	17, 17
D21S11	29, 31.2	30, 30	29, 30
D7S820	8, 11	10, 11	11, 11
D5S818	12, 12	11, 11	11, 13
TPOX	11, 11	8, 8	8, 9
DYS391	10	–	10
D8S1179	14, 15	13, 13	12, 13
D12S391	18, 23	18, 20	18, 24
D19S433	13, 14	14, 15	13, 14
FGA	20, 23	23, 24	24, 26
D22S1045	16, 16	11, 14	16, 18

[1]La información sobre las cadenas 9947A y 9948 está disponible en línea en:
http://ccr.coriell.org/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=GM09947 and
http://ccr.coriell.org/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=GM09948
La información sobre el uso del ADN 9947A y 9948 como plantillas de ADN estándar se puede encontrar en la referencia 25.

9.B. Métodos de extracción y cuantificación de ADN, y apoyo de automatización

Promega ofrece una amplia variedad de reactivos y métodos automatizados para la preparación de muestras, purificación de ADN y cuantificación de ADN antes de la amplificación de las STR.

Para análisis de bases de datos, referencia y otras muestras de una sola fuente, recomendamos la amplificación directa de perforaciones FTA® o el procesamiento preliminar de hisopos y perforaciones no FTA con el SwabSolution™ Kit o el PunchSolution™ Kit. El SwabSolution™ Kit (Cat.# DC8271) contiene reactivos para la rápida preparación de ADN de hisopos bucales antes de la amplificación. El procedimiento lisa las células contenidas en el extremo del hisopo y se libera en un solución suficiente de ADN para la amplificación de las STR. Una pequeña cantidad de extracto final de hisopo se agrega a la reacción del PowerPlex®. El kit PunchSolution™ es idóneo para procesar perforaciones a partir de tarjetas de almacenamiento no FTA que contienen muestras de sangre o bucales antes de la amplificación directa.

Para trabajar en casos o muestras que requieren purificación de ADN, recomendamos El DNA IQ™ System (N.º de Cat. DC6700), que es un sistema de aislamiento de ADN diseñado específicamente para muestras forenses (26). Este sistema utiliza partículas paramagnéticas para preparar muestras limpias con el fin de analizar fácil y eficientemente las STR, y se puede utilizar para extraer ADN de manchas o muestras líquidas, como por ejemplo sangre o soluciones. El DNA IQ™ Resin elimina los inhibidores y los contaminantes de la PCR que se encuentran frecuentemente en las muestras de casos. Con muestras ricas en ADN, el DNA IQ™ System ofrece una cantidad homogénea de ADN total. El sistema se ha utilizado para aislar el ADN de los tipos de muestras de rutina, que incluyen hisopos bucales, manchas en papel FTA® y sangre líquida. Adicionalmente, el ADN se ha aislado de muestras de casos, como por ejemplo tejidos, muestras de agresión sexual separadas de manera diferenciada y manchas en materiales de apoyo. El DNA IQ™ System ha sido evaluado con los PowerPlex® Systems para garantizar un proceso más eficiente.

Para aplicaciones que requieren cuantificación de ADN específicamente humano, se desarrolló el sistema Plexor® HY System (N.º de Cat. DC1000) (27). Este método basado en qPCR proporciona cuantificación total de ADN específicamente humano y masculino en una reacción. Adicionalmente, el Plexor® HY System proporciona un análisis de fusión posterior a la amplificación para confirmar los resultados positivos y el control de PCR interno (IPC) para confirmar los resultados negativos. La información adicional de pedido está disponible en la sección 9.E.

Para obtener información sobre la automatización de los métodos químicos en las estaciones de trabajo automatizadas utilizando soluciones Identity Automation™, comuníquese con su oficina local de Promega o con su distribuidor (la información de contacto está disponible en: **www.promega.com/support/worldwide-contacts/), correo electrónico:** genetic@promega.com o visite: **www.promega.com/idautomation/**

9.C. El CC5 Internal Lane Standard 500

El estándar de carril interno CC5 Internal Lane Standard 500 contiene 21 fragmentos de ADN de bases de 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 y 500 de largo (Figura 24). Cada fragmento se etiqueta con un tinte CC5 y se puede detectar por separado (como un quinto color) en presencia del material amplificado del PowerPlex® Fusion. El CC5 ILS 500 está diseñado para utilizar en cada inyección de CE para aumentar la precisión en los análisis cuando se utiliza el PowerPlex® Fusion System. Los protocolos para preparar y utilizar este estándar de carril interno se proporcionan en la sección 5.

Nota: El tamaño de los alelos Penta E y DYS391 de bases ≥ 475 no utilizará el Método local del sur. Para Penta E, los alelos >24 se etiquetarán como "OL".

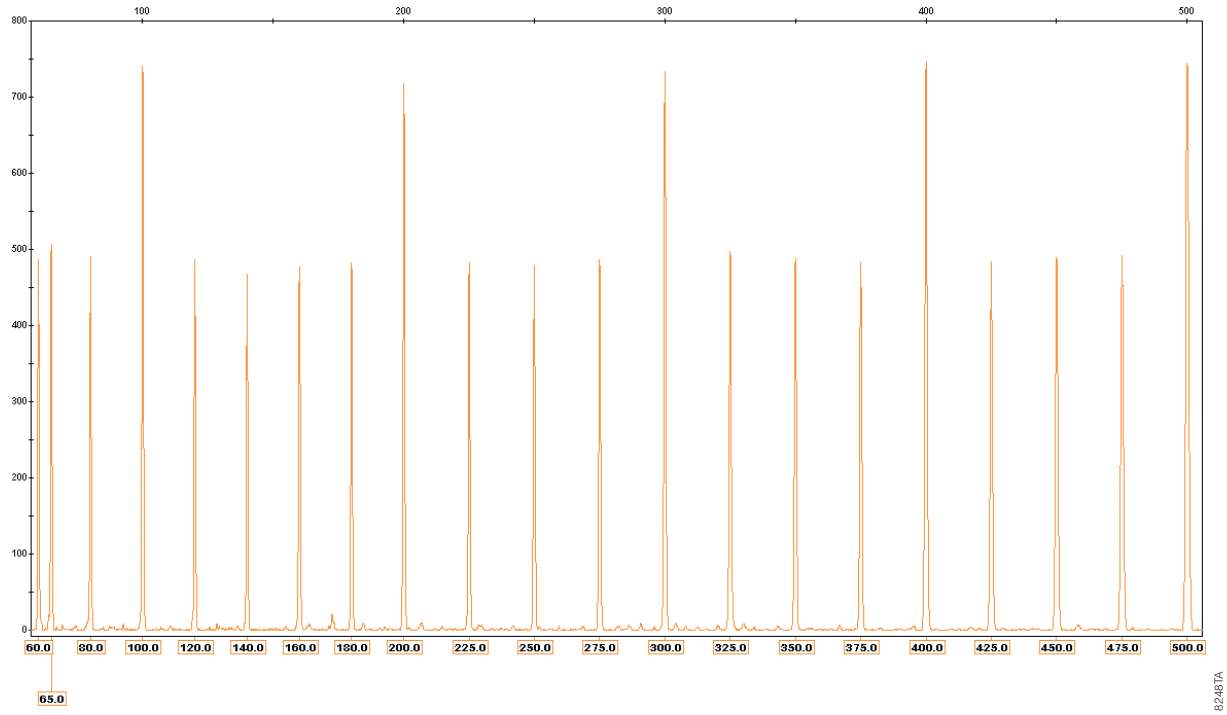

Figura 24. El CC5 Internal Lane Standard 500. Un electroferograma que muestra los fragmentos del CC5 Internal Lane Standard 500.

9.D. Composición de buffers y soluciones

Buffer TE^{-4} (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA [pH 8,0])

1,21 g	Base Tris
0,037 g	EDTA ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$)

Disuelva la base Tris y el EDTA en 900 ml de agua desionizada. Ajuste hasta un pH de 8,0 con HCl. Lleve el volumen final hasta 1 litro con agua desionizada.

Buffer TE^{-4} con 20 µg/ml de glucógeno

1,21 g	Base Tris
0,037 g	EDTA ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$)
20 µg/ml	glucógeno

Disuelva la base Tris y el EDTA en 900 ml de agua desionizada. Ajuste hasta un pH de 8,0 con HCl. Agregue glucógeno. Lleve el volumen final hasta 1 litro con agua desionizada.

9.E. Productos relacionados

Sistemas de STR

Producto	Tamaño	Nro. de Cat.
PowerPlex® Y23 System	50 reactivos	DC2305
	200 reactivos	DC2320
PowerPlex® 21 System	200 reactivos	DC8902
	4 × 200 reacciones	DC8942
PowerPlex® 18D System	200 reactivos	DC1802
	800 reactivos	DC1808
PowerPlex® ESX 16 System	100 reactivos	DC6711
	400 reactivos	DC6710
PowerPlex® ESX 17 System	100 reactivos	DC6721
	400 reactivos	DC6720
PowerPlex® ESI 16 System	100 reactivos	DC6771
	400 reactivos	DC6770
PowerPlex® ESI 17 Pro System	100 reactivos	DC7781
	400 reactivos	DC7780
PowerPlex® 16 HS System	100 reactivos	DC2101
	400 reactivos	DC2100
PowerPlex® CS7 System, Custom	100 reactivos	X6613

No debe ser utilizado para diagnóstico médico.

Componentes accesorios

Producto	Tamaño	Nro. de Cat.
PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130*	25 µl (cada tinte)	DG4700
PunchSolution™ Kit*	100 preparaciones	DC9271
SwabSolution™ Kit*	100 preparaciones	DC8271
CC5 Internal Lane Standard 500	300 µl	DG1521

9.E. Productos relacionados (continuación)

Componentes accesorios

Producto	Tamaño	Nro. de Cat.
PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130*	25 µl (cada tinte)	DG4700
PunchSolution™ Kit*	100 preparaciones	DC9271
SwabSolution™ Kit*	100 preparaciones	DC8271
CC5 Internal Lane Standard 500	300 µl	DG1521
ADN de control 2800M (10 ng/µl)*	25 µl	DD7101
ADN de control 2800M (0,25 ng/µl)*	500 µl	DD7251
Agua, grado de amplificación	6250 µl (5 × 1250 µl)	DW0991

*No debe ser utilizado para diagnóstico médico.

Preparación de muestras y sistemas de cuantificación de ADN

Producto	Tamaño	Nro. de Cat.
Sistema DNA IQ™ System	100 reactivos	DC6701
	400 reactivos	DC6700
Plexor® HY System*	800 reactivos	DC1000
	200 reactivos	DC1001

*No debe ser utilizado para diagnóstico médico.

Puntas resistentes al aerosol ART®

Producto Nro. de Cat.	Volumen	Tamaño (puntas/paquetes)	
ART® 10 Ultramicro Pipet Tip	0,5–10 µl	960	DY1051
ART® 20E Ultramicro Pipet Tip	0,5–10 µl	960	DY1061
ART® 20P Pipet Tip	20 µl	960	DY1071
ART® GEL Gel Loading Pipet Tip	100 µl	960	DY1081
ART® 100 Pipet Tip	100 µl	960	DY1101
ART® 100E Pipet Tip	100 µl	960	DY1111
ART® 200 Pipet Tip	200 µl	960	DY1121
ART® 1000E Pipet Tip	1000 µl	800	DY1131

(a)Patente estadounidense N.° 6 242 235, patente australiana N.° 761757, patente canadiense N.° 2 335 153, patente china N.° ZL99808861.7, patente de Hong Kong N.° HK 1040262, patente japonesa N.° 3673175, patente europea N.° 1088060 y otras patentes más que se encuentran pendientes.

(b)Patente estadounidense N.° 5 843 660, 6 479 235, 6 221 598 y 7 008 771, patente australiana N.° 724531, patente canadiense N.° 2 118 048 y 2 251 793, patente coreana N.° 290332, patente de Singapur N.° 57050, patente japonesa N.° 3602142 and 4034293, patente china N.° ZL99813729,4 y ZL97194967,0, patente europea N.° 0960207 y otras patentes más que se encuentran pendientes.

(c)Patente estadounidense N.° 6 238 863, patente europea N.° 1058727, patente china N.° ZL99802696.4, patente japonesa N.° 4494630 y otras patentes más que se encuentran pendientes.

(d)Los locus de las STR están sujetos a la patente estadounidense N.° RE 37.984, patente alemana N.° DE 38 34 636 C2 y otras patentes que se emitieron a Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften, e.V., Alemania.

(e)Autorizado por la patente estadounidense N.° 5 338 671 y 5 587 287 y las patentes correspondientes en otros países. Únicamente para su uso en investigación. No debe ser utilizado en procedimientos de diagnóstico.

[f]Las secuencias alélicas para uno o más de los locus vWA, FGA, D8S1179, D21S11 y las mezclas de escalera alélica D18S51 están autorizadas por la patente estadounidense N.° 7 087 380, 7 645 580, la patente australiana N.° 2003200444 y los reclamos de patentes correspondientes fuera de Estados Unidos.

[g]Los tintes TMR-ET, CXR-ET y CC5 son marcas patentadas.

[h]Este producto o partes de él se fabrican y venden con autorización de GE Healthcare según la patente australiana N.° 692230, la patente austríaca N.° E236994, la patente belga N.° 0743987, la patente canadiense N.° 2231475, la patente europea N.° 0743987 y 0851867, la patente francesa N.° 0743987 y 0851867, la patente alemana N.° 19581489, 69530286.8 y 0851867, la patente italiana N.° 0743987 y 0851867, la patente japonesa N.° 3066984, la patente liechtensteiniana N.° 0743987 y 0851867, la patente holandesa N.° 0743987 y 0851867, la patente española N.° 2197193 y 2173310, la patente sueca N.° 0743987 y 0851867, la patente suiza N.° 0743987 y 0851867, la patente británica N.° 0743987 y 0851867, la estadounidense N.° 5 654 419, 5 688 648, 5 869 255, 6 177 247, 5 707 804, 6 028 190, 6 544 744, 7 015 000 y 5 728 528 y otras solicitudes de patentes extranjeras y que se encuentran pendientes.

End User Terms and Conditions

Acceptance. These terms and conditions shall govern the purchase, use, transfer and acceptance of the products described in the purchase order, quotation or invoice, which products are sold and distributed by Promega to the buyer/transferee of such products (the "End User"). The transfer/sale of products to the End User is expressly conditional upon End User's acceptance of these terms and conditions.

Restrictions on Use. End Users are specifically not authorized to and are forbidden from reselling, transferring or distributing any products either as a stand alone product or as a component of another product. The right to use the products does not, in and of itself, include or carry any right of the End User to any GE Healthcare Bio-Sciences Corp.'s technology or intellectual property other than expressly provided herein. End Users may not use sequence(s) in an attempt to reverse engineer parameters of any of GE Healthcare Bio-Sciences Corp. proprietary products or services.

Disclaimer of Warranties. GE Healthcare Bio-Sciences Corp. provides no warranties to end user (statutory or implied), including without limitation, as to product quality, condition, description, merchantability or fitness for a particular purpose, and all such warranties are hereby expressly disclaimed. GE Healthcare Bio-Sciences Corp. hereby expressly disclaims any warranty regarding results obtained through the use of the products, including without limitation any claim of inaccurate, invalid or incomplete results.

Exclusion of Liability. GE Healthcare Bio-Sciences Corp. and its affiliates shall have no liability to an End User, including, without limitation, for any loss of use or profits, business interruption or any consequential, incidental, special or other indirect damages of any kind, regardless of how caused and regardless of whether an action in contract, tort, strict product liability or otherwise.

© 2012 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Plexor and PowerPlex are registered trademarks of Promega Corporation. DNA IQ, Identity Automation, PunchSolution and SwabSolution are trademarks of Promega Corporation.

ABI PRISM and MicroAmp are registered trademarks of Applera Corporation. Applied Biosystems and GeneMapper are registered trademarks of Applied Biosystems. ART is a registered trademark of Molecular Bio-Products, Inc. Bode Buccal DNA Collector is a trademark of the Bode Technology Group, Inc. EasiCollect is a trademark of Whatman. FTA is a registered trademark of Flinders Technologies, Pty, Ltd., and is licensed to Whatman. GeneAmp is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. Hi-Di, POP-4 and POP-7 are trademarks of Applera Corporation. OmniSwab is a trademark of Whatman. Sampact is a trademark of Fitzco. Vacutainer is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.